

**CENTRO INTERNACIONAL DE ALTOS ESTUDIOS AGRONÓMICOS
MEDITERRANEOS**

INSTITUTO AGRONOMICO MEDITERRÁNEO DE ZARAGOZA

**ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN
EL PLASMA Y LECHE DE LA OVEJA Y EN EL PLASMA Y LA CARNE DE
CORDEROS LECHALES SEGÚN LA ALIMENTACIÓN RECIBIDA POR LA
MADRE**

CAMELIA RADU

AGRADECIMIENTOS

Quería expresar mi más sincero agradecimiento y reconocimiento a todas las personas e instituciones que de una u otra manera han hecho posible la realización de esta tesis:

Al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza por aceptarme en el programa del Master Internacional en Nutrición Animal.

Al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón y al Gobierno de Aragón en cuyas instalaciones se ha realizado este trabajo.

A Mireia Blanco y Margarita Joy por aceptar hacer parte del presente trabajo, por sus consejos, por su ayuda y confianza durante la realización de esta memoria y sobre todo por la paciencia y la dedicación ofrecida.

A Angelines Legua por su apoyo y sus conversaciones que siempre me hacían ver la parte buena de las cosas, a Francisco Molino por sus consejos, su paciencia y sus conocimientos, a Sandra Lobón, por su ayuda su asesoramiento y su apoyo siempre que lo he necesitado.

A todo el personal del Departamento de Producción Animal por ser el mejor equipo.

A mis padres y mis hermanos por estar siempre a mi lado y por su apoyo incondicional. GRACIAS os quiero mucho.

A Nacho Santos y a mis compañeros Corina Oprea y José Manuel por su comprensión y su confianza en mí.

A mis amigos y todos los que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo ya todos que me dieron ánimos para ello.

A todos vosotros, GRACIAS

RESUMEN

Los consumidores son cada vez más conscientes de la importancia de la calidad de los alimentos que compran y de su relación con la salud, por lo que demandan más información tanto del valor nutricional como del sistema de producción en el que vive el animal. Obtener dicha información y garantizar los controles demandados sólo es posible con un sistema de trazabilidad de todo el proceso productivo.

Este estudio se ha centrado en la relación de la presencia de determinados biomarcadores (carotenoides, retinol y tocoferoles) en los productos animales con el sistema de alimentación (Pastoreo vs. Estabulado) y la inclusión de taninos condensados en el pienso (Con vs. Control). Se han utilizado 39 ovejas con sus corderos de raza Churra Tensina, distribuidos en 4 lotes equilibrados según el peso de la oveja y del cordero al parto, la condición corporal y el sexo del cordero. Las ovejas y corderos del tratamiento Pastoreo pastaron en praderas mientras que las ovejas y sus corderos del tratamiento Estabulado fueron alimentados con heno de pradera, todas ellas *ad libitum*. Dentro de cada tipo de forraje, a la mitad de las ovejas se les ofrecía 300 g de pienso comercial (Control) y a la otra mitad 300 g de pienso con taninos condensados (TC) (inclusión de 10 % de quebracho con un 75 % de TC). El ensayo se inició tras el parto y se prolongó hasta que los corderos alcanzaron el peso vivo de 10-12 kg. Semanalmente se tomaron muestras de alimentos y de leche y quincenalmente de la sangre de las ovejas y corderos para determinar las concentraciones de los biomarcadores a estudiar. Semanalmente, cuando los corderos alcanzaban el peso de sacrificio, se sacrificaban. Tras el faenado, las canales se mantuvieron a 4 °C durante 24 h. Se tomaron muestras del músculo *Longissimus thoracis* y del *Semitendinosus*, que se congelaron, liofilizaron y picaron para la extracción del carotenoides y retinol y tocoferoles, determinándose por cromatografía líquida con HPLC.

La concentración de carotenoides y tocoferoles fueron mayores en el pasto que en el heno y el pienso ($P < 0,05$). La concentración de retinol y α -tocoferol en el plasma de las ovejas durante la lactación estuvo afectada por la interacción entre el forraje recibido por la oveja y la fase de la lactación ($P < 0,05$). La concentración de retinol en las ovejas del lote Estabulado no se modificó durante la lactación mientras que en las ovejas del lote Pastoreo se incrementó al final de ésta. En relación al α -tocoferol, la concentración se modificó a partir de la segunda mitad de la lactación en las ovejas del

tratamiento Estabulado mientras que en las ovejas en pastoreo se incrementó a medida que avanzaba la lactación. De media, el tratamiento Estabulado presentó menor concentración de retinol (12,76 vs. 15,54 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) y α -tocoferol que el tratamiento Pastoreo (0,68 vs. 1,11 $\mu\text{g/ml}$). La inclusión de taninos condensados no tuvo efecto sobre la concentración de vitaminas en el plasma de la oveja.

La leche de las ovejas del tratamiento Pastoreo presentó mayor concentración de retinol y de α -tocoferol que la leche de las ovejas del tratamiento Estabulado. Además, la concentración de retinol y de α -tocoferol fue máxima al inicio de la lactación. En cuanto a la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja, sólo se observó que incrementaban la concentración de retinol y α -tocoferol en la leche al inicio de la lactación ($P < 0,05$).

Al igual que en el plasma de las ovejas, también se observaron diferencias en los contenidos de retinol y α -tocoferol en el plasma de los corderos según el tipo de forraje ingerido por la oveja, presentando los del tratamiento Pastoreo mayor concentración de retinol y α -tocoferol que los del lote Estabulado ($P < 0,05$). Ello indica que la alimentación de la madre durante la lactancia tiene efecto sobre la composición de retinol y α -tocoferol en el plasma de los corderos. Los taninos condensados no afectaron a la concentración de dichos compuestos en el plasma de los corderos.

El retinol y α -tocoferol depositados en la carne se han visto fundamentalmente afectados por el tipo de forraje ingerido por la oveja y el tipo de músculo ($P < 0,05$). Los corderos del tratamiento Pastoreo presentaron mayor concentración de α -tocoferol y retinol que los del tratamiento Estabulado en el músculo *Longissimus thoracis* y *Semitendinosus* ($P < 0,05$). Además, la luteína, que se detectó únicamente en el músculo *Semitendinosus*, también fue mayor en los corderos del tratamiento Pastoreo que en el Estabulado. La inclusión de taninos condensados únicamente afectó a la concentración de α -tocoferol en el músculo *Longissimus thoracis* (1,44 vs. 1,27 mg/ kg MF para Taninos Condesados y Control, respectivamente).

El uso de la concentración de retinol y α -tocoferol en un análisis discriminante permitió parcialmente distinguir la procedencia de los corderos lechales según el tipo de forraje ingerido por la madre. Sin embargo, para obtener un porcentaje de clasificación cercano al 100% se debe seguir estudiando otros posibles biomarcadores.

SUMMARY

Consumers are becoming more aware of the importance of food quality in the products they purchase and their relation with health, demanding more information both on the nutritional value as well as on the animal production systems used to rear the animal. Obtaining this information and guaranteeing the necessary control, can only be possible when implementing a traceability system throughout the whole production process.

This study has focused on the relation of the existence of certain biomarkers (carotenoids, retinol, tocopherols) in animal products with the feeding systems (Grazing vs. Housing) and the addition of condensed tannins in the feedstuff (Added vs. Control). Thirty-nine ewes of the Churra Tensina breed and their lambs we used, distributed into 4 lots adjusted according to the weight of the ewe and the lamb at lambing, body condition and sex of the lamb. The sheep and lambs of the Grazing treatment grazed in pastures while those of the Housing treatment were fed with pasture hay, all of them *ad libitum*. Within each type of forage, half of the ewes were offered 300 g of commercial concentrate (Control) and the other half was fed 300 g of a concentrate with condensed tannins (CT) (adding 10% of quebracho with a 75% of CT). The assay started after lambing and continued until the lambs reached a live weight of 10- 12 kg. Weekly samples were taken of the feed and the milk, and every fortnight blood samples were collected from the sheep and lambs to determine the concentrations of the biomarkers that were to be studied. Lambs were slaughtered weekly when reaching the required slaughter weight. After dressing the carcasses, these were kept at 4°C during 24h. Samples were taken from the *Longissimus thoracis* and *Semitendinosus* muscles, that were frozen, freeze-dried and grounded to extract the carotenoids, retinol and tocopherols, being these determined by using liquid chromatography with HPLC.

The concentration of carotenoids and tocopherols was greater in the case of pasture than hay and concentrates ($P < 0,05$). The concentration of retinol and α -tocopherol in ewe plasma during lactation was affected by the interaction between the forage fed to the sheep and the lactation period ($P < 0,05$). Retinol concentration in sheep from the Housing lot was not modified during lactation though it increased at the end of the period in the sheep of the Grazing lot. In the case of α -tocopherol, the concentration was modified starting after the second half of lactation in the ewes of the Housing treatment, while in the case of the Grazing ewes it increased as lactation advanced. On average, the Housing treatment showed less concentration of retinol (12,76 vs. 15,54 $\mu\text{g/ml}$,

respectively) and α -tocopherol than the Grazing treatment (0,68 vs. 1,11 $\mu\text{g/ml}$). The addition of condensed tannins had no effect on the concentration of vitamins in lamb plasma.

Milk from the Grazing treatment ewes presented a higher concentration of retinol and α -tocopherol than the milk from the Housing treatment ewes. Furthermore, retinol and α -tocopherol concentration was highest at the beginning of lactation. As for the addition of condensed tannins in ewe's concentrate, an increase of retinol and α -tocopherol concentration was observed only at the beginning of lactation ($P < 0.05$).

As in the case of sheep plasma, differences were also observed in the retinol and α -tocopherol content in lamb plasma according to the type of forage eaten by their dams, presenting those of the Grazing treatment a greater concentration of retinol and α -tocopherol than those of the Housing treatment ($P < 0.05$). This indicates that the feeding of the ewe during lactation has an effect on the composition of retinol and α -tocopherol in lamb serum. Condensed tannins did not affect the concentration of the compound in lamb serum.

Retinol and α -tocopherol deposited in the meat has been fundamentally affected by the type of forage eaten by the sheep and the type of muscle ($P < 0,05$). Lambs of the Grazing treatment exhibited a greater concentration of α -tocopherol and retinol in the *Longissimus thoracis* and *Semitendinosus* muscle ($P < 0,05$) than those of the Housing treatment. Similarly, the lutein that was detected only in the Semitendinosus muscle was also greater in the case of lambs in the Grazing treatment than those of the Housing treatment. The addition of condensed tannins only affected the concentration of α -tocopherol in the *Longissimus thoracis* muscle (1,44 vs. 1,27 mg/kg MF for Condensed Tannins and the Control respectively).

The used of retinol and α -tocopherol in a discriminant analysis allowed to partially distinguish the origin of the suckling lambs according to the type of forage ingested by the ewe. However, in order to obtain a classification percentage close to 100 %, other possible biomarkers must be further studied

.

RÉSUMÉ

Les consommateurs sont de plus en plus conscients de l'importance de la qualité des aliments qu'ils achètent et de leur relation avec la santé, raison pour laquelle ils demandent de plus en plus d'information aussi bien sur la valeur nutritive que sur les systèmes de production des animaux. Obtenir ce type d'information et garantir les contrôles nécessaires, ne peut être possible que si un système de traçabilité tout au long du processus de production a été implanté.

Cette étude a mis l'accent sur la relation de l'existence de certains biomarqueurs (caroténoïdes, rétinol, tocophérols) dans les produits animaux avec les systèmes d'alimentation (Pâturage vs. Stabulation) et l'ajout de tanins condensés dans l'aliment (avec par rapport au témoin). On a utilisé 39 brebis de la race Churra Tensina et leurs agneaux, répartis en 4 lots ajustés en fonction du poids de la brebis et de l'agneau au l'agnelage, de l'état corporel et du sexe de l'agneau. Les brebis et les agneaux du traitement Pâturage ont pâturé sur prairie, tandis que les animaux du traitement Stabulation ont été nourris à base de foin de prairie, et tous *ad libitum*. Au sein de chaque type de fourrage, on distribuait à la moitié des brebis 300 g de concentré commercial (Témoin) et à l'autre moitié 300 g de concentré avec des tanins condensés (TC) (avec 10% de quebracho avec 75% de TC). Le test a commencé après l'agnelage et a continué jusqu'à ce que les agneaux aient atteint un poids vif de 10-12 kg. Des échantillons hebdomadaires d'aliments et de lait ont été prélevés et tous les quinze jours des prises de sang ont été faites, aussi bien chez les brebis que chez les agneaux. Toutes les semaines, les agneaux étaient abattus lorsque le poids à l'abattage était atteint. Après l'abattage, les carcasses ont été conservées à 4°C pendant 24h. Des échantillons ont été prélevés dans les muscles *Longissimus thoracis* et *Semitendinosus* et ils ont été ensuite congelés, lyophilisés et hachés. Les caroténoïdes, le rétinol et les tocophérols ont été déterminées par chromatographie liquide avec HPLC.

La concentration des caroténoïdes et des tocophérols était plus élevée dans le cas des pâturages que du foin et concentré ($P < 0.05$). La concentration en rétinol et en α -tocophérol dans le plasma des brebis pendant la lactation a été affectée par l'interaction entre le fourrage reçu par l'animal et la période de lactation ($P < 0.05$). La concentration en rétinol chez les brebis du lot Stabulé n'a pas été modifiée tandis que chez les brebis du lot Pâturage elle a augmenté à la fin de la période. Dans l' α -tocophérol, la concentration a été modifiée à partir de la deuxième moitié de la lactation chez la brebis

du traitement Stabulé, tandis que chez les brebis au Pâturage, elle a augmenté au fur et à mesure que la lactation avançait. En moyenne, le traitement Stabulé a montré moins de concentration en rétinol (12,76 vs. 15,54 µg/ml, respectivement) et d'α-tocophérol (0,68 vs. 1,11 µg/ml) que le traitement Pâturage. L'addition de tanins condensés n'a eu aucun effet sur la concentration en vitamines dans le sérum de la brebis.

Le lait des brebis du traitement Pâturage a présenté une concentration plus élevée en rétinol et en α-tocophérol que le lait des brebis du traitement Stabulé. En plus, la concentration en rétinol et en α-tocophérol a été maximale au début de la lactation. En ce qui concerne l'addition de tanins condensés dans l'aliment de la brebis, on a seulement observé qu'elle augmentait la concentration en rétinol et en α-tocophérol au début de la lactation ($P < 0.05$).

Des différences ont également été observées dans le rétinol et dans l'α-tocophérol contenu dans le plasma des agneaux selon le type de fourrage ingéré par la brebis. Ceux qui ont eu le traitement Pâturage ont présenté une plus grande concentration en rétinol et en α-tocophérol que ceux du lot Stabulé ($P < 0.05$). Ceci indique que l'alimentation de la brebis pendant la lactation a un effet sur la composition en rétinol et en α-tocophérol dans le sérum des agneaux. Les tanins condensés n'ont pas affecté la concentration de ces composés dans le sérum des agneaux.

Le rétinol et l'α-tocophérol déposés dans la viande ont été fondamentalement affectés par le type de fourrage ingéré par la brebis et le type de muscle ($P < 0,05$). Les agneaux du traitement Pâturage ont présenté une plus grande concentration en α-tocophérol et en rétinol que ceux du traitement Stabulation dans le *Longissimus thoracis* et *Semitendinosus* ($P < 0,05$). La lutéine, qui a été détectée seulement dans le muscle *Semitendinosus*, était plus importante dans les agneaux au Pâturage que chez ceux en Stabulation. L'addition de tanins condensés a seulement affecté la concentration en α-tocophérol dans le muscle *Longissimus thoracis* (1,44 vs 1,27 mg/kg MF pour les Tanins Condensés et le témoin, respectivement).

L'utilisation de la concentration en rétinol et en α-tocophérol dans une analyse discriminante a permis de faire la distinction partiellement de l'origine des agneaux de lait en fonction du type de fourrage ingéré par la brebis. Cependant, pour obtenir un pourcentage de classification proche de 100%, il faudra continuer à étudier d'autres biomarqueurs possibles.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El sector ovino en España	3
1.2. Importancia del ovino de carne en Aragón	5
1.3. Sistemas de producción y su trazabilidad	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Biomarcadores	11
2.1.1. Los carotenoides	12
2.1.2. La vitamina A	13
2.1.3. La vitamina E	14
2.2. Metabolismo de los biomarcadores	15
2.2.1. Absorción	15
2.2.2. Transporte	16
2.2.3. Funciones	17
2.3. Presencia de carotenoides, retinol y tocoferol en los alimentos	18
2.3.1. Forrajes	18
2.3.2. Piensos	18
2.4. Presencia de carotenoides, retinol, α -tocoferol en los productos animales	20
2.4.1. Según la especie animal	20
2.4.2 Según la alimentación recibida	21
2.4.2.1. En el suero o plasma	21
2.4.2.2. En la leche	22
2.4.2.3. En el músculo	23
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS	29
4.1. Localización	31
4.2. Superficies forrajeras	32

4.3. Manejo del rebaño experimental	32
4.4. Animales y dietas experimentales	33
4.5. Medidas realizadas	35
4.6. Métodos de análisis de los carotenoides, retinol y tocoferoles.....	36
4.6.1. Métodos de extracción.....	37
4.6.1.1. Alimento	37
4.6.1.2. Leche	38
4.6.1.3. Plasma.....	39
4.6.1.4. Músculos Longissimus thoracis y Semitendinosus	40
4.7. Condiciones cromatográficas	41
4.8. Análisis estadísticos.....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1. Contenido en carotenoides y tocoferoles de los alimentos.....	45
5.2. Concentración de vitaminas liposolubles según el forraje recibido por la oveja	46
5.2.1. En el plasma de la oveja	46
5.2.2. En la leche de la oveja	49
5.2.3. En el plasma de los corderos	51
5.2.4. En el músculo de los corderos	54
5.3. Concentración de vitaminas liposolubles según la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja	56
5.3.1. En el plasma de la oveja	57
5.3.2. En el músculo del cordero	62
5.3.2. En la leche de la oveja	59
5.3.3. En el plasma del cordero	61
5.4. Análisis discriminantes.....	64
6. CONCLUSIONES.....	69
7. BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los alimentos ingeridos por las ovejas	34
Tabla 2. Contenido en carotenoides y tocoferoles del heno, pradera y pienso control y pienso con taninos condensados (TC)	45
Tabla 3. Contenido de carotenoides y tocoferoles en heno, pradera y pienso encontrados en la bibliografía.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los principales carotenoides encontrados en el forraje	12
Figura 2. Estructura química de la vitamina A.....	14
Figura 3. Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles.	14
Figura 4. Localización geográfica de la estación experimental de “La Garcipollera”... 31	
Figura 5. Pluviometría y temperaturas máxima y mínima registrados el año 2014.	32
Figura 6. Esquema del diseño experimental.....	33
Figura 7. Concentración de retinol en el plasma de la oveja según el forraje recibido por la oveja durante la lactación.	47
Figura 8. Concentración de α -tocoferol en el plasma de la oveja según el forraje recibido durante la lactación.....	48
Figura 9. Concentración de retinol en la leche según el forraje recibido por la oveja durante la lactación.....	49
Figura 10. Concentración de α -tocoferol en la leche según el forraje ingerido por las ovejas.....	51
Figura 11. Concentración de retinol en el plasma de los corderos según el forraje ingerido por la madre.....	52
Figura 12. Concentración de α -tocoferol en el plasma de los corderos durante la lactación según el forraje ingerido por la madre.	53
Figura 13. Concentración de luteína, retinol y α -tocoferol en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> y <i>Semitendinosus</i> de los corderos según el forraje ingerido por la madre.....	55
Figura 14. Concentración de retinol en el plasma de la oveja en las fases de la lactación según la inclusión de taninos condensados en el pienso.	57
Figura 15. Concentración de α -tocoferol e el plasma de la oveja según la inclusión de taninos condensados en el pienso durante la lactación.....	58
Figura 16. Concentración de retinol en la leche según la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja durante la lactación.....	59
Figura 17. Concentración de α -tocoferol en la leche según la inclusión de taninos condensados en la dieta durante la lactación.....	60
Figura 18. Concentración de retinol en el plasma de los corderos según la inclusion de taninos en el pienso de la madre.....	61

Figura 19. Concentración de α -tocoferol en el plasma de los corderos según la inclusión de taninos en el pienso de la madre.	62
Figura 20. Contenido de luteína, retinol y α -tocoferol en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> y <i>Semitendinosus</i> de los corderos según la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja.....	63
Figura 21. Porcentaje de ovejas clasificadas en su tratamiento según la concentración de retinol y α -tocoferol en el plasma en las tres fases de la lactación.....	65
Figura 22. Porcentaje de ovejas clasificadas en su tratamiento según la concentración de retinol y α -tocoferol en la leche según la semana de la lactación.	65
Figura 23. Porcentaje de corderos clasificados en su tratamiento según la concentración de retinol y α -tocoferol en el plasma según la fase de la lactación.	66
Figura 24. Porcentaje de corderos clasificados en su tratamiento según la concentración de retinol y α -tocoferol en el músculo.....	67

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El sector ovino en España

El ganado ovino se ha considerado tradicionalmente una ganadería de menor importancia y en muchas ocasiones asociada a países o regiones de bajo desarrollo socioeconómico y cultural, con una diferencia notable respecto a otras especies de animales ganaderas. Este sector ganadero tiene un importante papel en la vertebración del territorio, aprovechamiento de los recursos naturales así como un papel esencial en asegurar la cohesión del tejido rural y el uso sostenible de hábitats en las zonas donde se asienta.

La evolución de la cabaña ovina mundial ha sufrido importantes cambios a lo largo de las últimas décadas. En 2011, según datos de FAOSTAT, el censo mundial ascendió a 1.043.712.633 animales, lo que supone un marcado descenso del 3,26% respecto al censo del año anterior y pone de manifiesto la tendencia a la baja en el censo mundial durante los últimos años (Buxadé Carbó, 2014). La producción total de carne de ovino en la UE en 2012 fue de 885.205 toneladas (de las que casi el 13,87% se produjeron en nuestro Estado). Aunque el descenso de la producción es general, se ve un tanto mitigado en aquellos años en los que ha habido incorporaciones de Estados Miembros con importantes efectivos ganaderos (2004 y 2007) (Buxadé Carbó, 2014). El ganado ovino español representó el 20% de la cabaña ovina de la Unión Europea siendo únicamente superado por el Reino Unido con un 27% en 2013 (MAGRAMA, 2013).

El sector ovino-caprino en el Estado español representa el 8% de la producción final ganadera. En cuanto al número y estructura de explotaciones, los últimos datos apuntan a un notable descenso en las explotaciones de ovino en los últimos años (de las 122.694 explotaciones registradas en 2007 se ha pasado a un total de 111.787 explotaciones en enero de 2013).

La actualidad de este sector en España, viene marcada por:

- La subida de los precios de los piensos y la falta de pastos
- La reforma de la organización común de mercados de la carne de ovino, que regula su producción, precios y mercados, especialmente por la reforma de la Política Agrícola Común (PAC) actual

- La creciente profesionalización y aumento de la dimensión de las explotaciones, unido a la dificultad de renovación de la mano de obra y de rentabilidad de las explotaciones
- Finalmente por las distintas enfermedades que amén de reducir el estatus sanitario de la cabaña limitan su movimiento, sus rendimientos o el empleo para la alimentación de sus productos como recientemente han podido ser la brucelosis, la lengua azul o el scrapie (MAGRAMA, 2008)

En España predomina el empleo de razas de elevada rusticidad, perfectamente adaptadas al medio rural, de pequeño formato y empleadas en sistemas extensivos con pastoreo. La producción de corderos se caracteriza por un sacrificio en edades tempranas, dando lugar a canales pequeñas con distinta conformación y menores rendimientos que los presentes en países nórdicos de la UE, lo que condiciona su exportación (MAGRAMA, 2008). Su consumo no es constante, con un incremento notable en determinadas épocas del año debido al carácter festivo y de celebración de su consumo, fuertemente arraigado en esta cultura.

Para mejorar la situación actual, el sector tiene fundamentalmente ante sí tres grandes retos:

- El mantener su función social en el medio rural, contribuyendo paralelamente a mantenimiento de los ecosistemas naturales y de formas tradicionales de vida íntimamente vinculadas a la cultura de numerosas regiones de España. Para ello, el sector ha de ofrecer nuevos y mayores atractivos económicos, sociales y culturales para frenar y contrarrestar el abandono por parte de los jóvenes vivido por este sector en las últimas décadas.
- El fomento de la producción de carnes y productos cárnicos de calidad certificada, de mayor valor añadido y el aumento de las cuotas de mercado conseguidas por los mismos.
- La conquista de nuevos mercados dentro y fuera de la Unión Europea y mantenimiento de los creados en los últimos años ya que las exportaciones se han duplicado desde 2003 a 2013 pasando de 22303 t a 45495 t (MAGRAMA, 2013)

1.2. Importancia del ovino de carne en Aragón

En la comunidad autónoma de Aragón se encuentra el 11,3% del total nacional de cabezas de ovinos con un censo total de 1.877.551 cabezas en 2013 (MAGRAMA, 2013). Actualmente, la carne de ovino sufre la retracción de un consumo que ya de por sí es bajo y estacional. Durante los últimos seis años, se ha pasado de un consumo per cápita de carne fresca de ovino y caprino en los hogares españoles de 2,7 kg en 2006 a 1,9 kg (datos provisionales en 2013).

El sistema de producción varía según la zona geográfica debido a los condicionantes de producción forrajera, ya que existen grandes diferencias entre las tres provincias (Zaragoza, Huesca y Teruel) en cuanto a disponibilidad de pasto natural y cultivos forrajeros, lo que a su vez condiciona el manejo reproductivo y la cría de los corderos. Los sistemas más comunes de producción se basan en el destete temprano de corderos (45 días) y el posterior cebo con pienso, para obtener canales ligeras tipo "Ternasco" (peso canal 8 – 12,5 kg, menor a 3 meses de edad). El manejo general es estabulación de ovejas 15 días antes del parto y mantenerlas así hasta el destete de los corderos. El sistema de reproducción que se lleva es el de 3 partos en dos años. Esta dinámica de intensificación se ha establecido también en la mayoría de explotaciones ovinas de Aragón, lo que ha supuesto en algunas explotaciones una drástica reducción en el aprovechamiento de los amplios recursos pastorales disponibles en las zonas de montaña (Choquecallata, 2000).

Este manejo es contrario a las actuales directrices de la Política Agraria Común, que promueven un mayor uso de los recursos pastorales, así como el mantenimiento de razas autóctonas. Actualmente, y gracias a las ayudas para la conservación de razas, se realizan estudios para estudiar los parámetros productivos de dichas razas en condiciones extensivas así como la calidad de la carne como producto final. En relación a ello, se buscan posibles alternativas para reducir costes de alimentación y revalorizar el producto comercial final en razas autóctonas de baja productividad como es la raza Churra Tensina (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2007, Sanz *et al.*, 2008). En aquellas explotaciones con estacionalidad marcada de los recursos pastorales, la producción de cordero lechal de la raza Churra Tensina (9-12 kg, menor a 35 días de edad), aunque no es habitual, podría ser una alternativa interesante.

1.3. Sistemas de producción y su trazabilidad

Los sistemas producción de corderos más extendidos actualmente en España se iniciaron en los años 60 y respondían a unas necesidades históricas muy concretas: producir alimentos de origen animal a precios asequibles. El cebo con concentrados y paja permitió, por su facilidad técnica y su escasa necesidad en mano de obra, generalizar el consumo de carne. Estos sistemas han ido evolucionando técnicamente, alcanzando altos niveles de eficiencia técnico-económica, pero desvinculando totalmente al rumiante de sus condiciones naturales de producción, el pastoreo, y dando como resultado final productos de alta calidad escasamente diferenciados, sin una alimentación ni un manejo de los animales transparente hacia el consumidor.

Tras los últimos escándalos alimentarios relacionados con la ganadería en general, y especialmente en la producción de carne (encefalopatías dioxinas, promotores del crecimiento...) una parte importante de la población ha perdido la confianza tanto en la carne como en los productores o ganaderos. El consumidor, exige un producto sano y de calidad que debe ser ofrecido con un conocimiento científico que en algunos casos es escaso (Prache *et al.*, 2009).

Muchos son los factores que influyen en la calidad del producto (raza, estado fisiológico, edad, mercado, sanidad, bienestar animal), siendo la alimentación el más importante. En los productos animales con valor añadido, como puede ser la denominación de origen, la indicación geográfica protegida o producción ecológica, los consumidores exigen algún tipo de certificación, que le asegure que el producto en su origen haya respetado el pliego de condiciones por las que se vende con un valor añadido. La certificación de calidad asegura el valor añadido a un producto en beneficio de los productores y a los consumidores ya que proporciona la garantía de que el producto ofrecido cumple los requisitos exigidos por la marca. En los casos en que el valor añadido de un producto se deba al tipo de alimentación recibida se deben buscar posibles “marcadores” que puedan relacionar el tipo de alimentación del animal y el producto, es decir compuestos químicos que por algún motivo estén ligados a un tipo de alimento y que se acumulen o expresen en el producto final, como es la carne o la leche.

La trazabilidad es un importante componente en la política de calidad en el sector agroalimentario. Está definida por el estándar internacional ISO 8402 como “la habilidad de rastrear la historia, aplicación, o localización de una entidad por medio de

identificaciones guardadas” (Charlier, 2003). La trazabilidad puede ser del origen o del sistema de producción o proceso. La primera se refiere a la identidad de los animales, raza, origen geográfico, lo que es muy importante para las marcas de calidad (Denominación de origen o Indicación geográfica protegida). La segunda trazabilidad es la del proceso y se refiere a los sistemas de producción, incluyendo tipos de dietas, procesos, conservación y adulteración de los alimentos ofrecidos al animal (producción ecológica, extensiva...).

En los últimos años los consumidores tienen un mayor interés por la imagen "verde" de productos de origen animal, exigiendo productos alimenticios basados en forrajes que se consideran seguros, naturales y respetuosos con el medio ambiente y el bienestar animal (Prache *et al.*, 2005). Además, hay cada vez más una demanda de información clara sobre la alimentación suministrada a los animales. La alimentación que reciben los animales destinados al consumo humano es uno de los factores extrínsecos de calidad considerados más importantes por los consumidores (Casasús *et al.*, 2007). Sin embargo, no siempre se dispone de esta información, por lo que es necesario desarrollar sistemas de biodetección que garanticen una adecuada trazabilidad del sistema de producción seguido, en este caso de la composición de la dieta recibida. Se deben buscar compuestos químicos que por algún motivo estén ligados a un tipo de alimento y que se acumulen o expresen en el producto final, como es la carne o la leche.

El sistema de alimentación a que se somete al animal (a base de leche, forraje, concentrado, o combinado) va a condicionar el éxito de discriminación de los distintos biomarcadores presentes en los alimentos y transmitidos al producto, que a su vez se encuentran afectados por complejidad de mecanismos que envuelven a la producción de forrajes, la producción de leche, así como a los cambios en la composición de los tejidos corporales a lo largo de las distintas fases de crecimiento.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomarcadores

Tres grupos de compuestos pueden ser considerados como posibles indicadores de la alimentación recibida por el animal. Los biomarcadores pueden ser:

1. *Compuestos de origen vegetal*, como son los carotenoides, vitamina A, vitamina E y los compuestos fenólicos. Su presencia en los tejidos animales indican su procedencia alimentaria, ya que el animal no es capaz de sintetizarlos
2. *Marcadores metabólicos o metabolitos secundarios* que son compuestos procedentes del metabolismo del animal que varían en proporción y tipo en función del tipo de alimento (composición en ácidos grasos)
3. *Marcadores físicos* los cuales utiliza la composición isotópica de la grasa y del agua de los tejidos y productos animales que depende del tipo de dieta y del área geográfica (Renou *et al.*, 2004a, Renou *et al.*, 2004b) (relaciones $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$; $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$; $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

De todos estos posibles marcadores, lo primero que se debe estudiar es su capacidad de discriminar el producto, es decir clasificarlo según el régimen alimenticio recibido con un margen de error pequeño. Actualmente los estudios realizados muestran que los diversos marcadores analizados individualmente sólo permiten la clasificación del producto con un error grande, o al menos mayor que el deseado. Además se observa que existe una gran variabilidad individual en los contenidos de dichos compuestos (Prache *et al.*, 2005). Por ello se debe buscar una combinación de dos o más marcadores que permitan clasificar con un margen de error pequeño la procedencia del producto según el sistema de alimentación.

Es necesario buscar los marcadores que puedan indicar de manera más precisa la alimentación recibida por el animal, como pueden ser los pigmentos carotenoides y vitamina E. Los carotenoides y las vitaminas liposoluble (Vitamina A y E) junto con la composición de ácidos grasos han sido identificados en los últimos años como potenciales marcadores del sistema de alimentación dando unos resultados esperanzadores (Prache *et al.*, 2005).

Esta memoria se va a centrar en los pigmentos carotenoides y las vitaminas liposolubles A y E.

2.1.1. Los carotenoides

Los pigmentos carotenoides son una familia de más de 600 moléculas sintetizadas por plantas y algas, relacionadas con el proceso de la fotosíntesis (Nozière *et al.*, 2006a). Son los pigmentos responsables de la mayoría de los colores amarillos, anaranjados y rojos de las plantas, debido a la presencia en su molécula de un cromóforo consistente total o principalmente en una cadena de dobles enlaces conjugados.

Químicamente los carotenoides son terpenoides, formados básicamente por ocho unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula. En los carotenoides naturales sólo se encuentran tres elementos: C, H y O. El oxígeno puede estar presente como grupo hidroxilo, metoxilo, epoxi, carboxilo o carbonilo. Dentro de los carotenoides podemos distinguir dos grupos: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, que poseen oxígeno en su molécula.

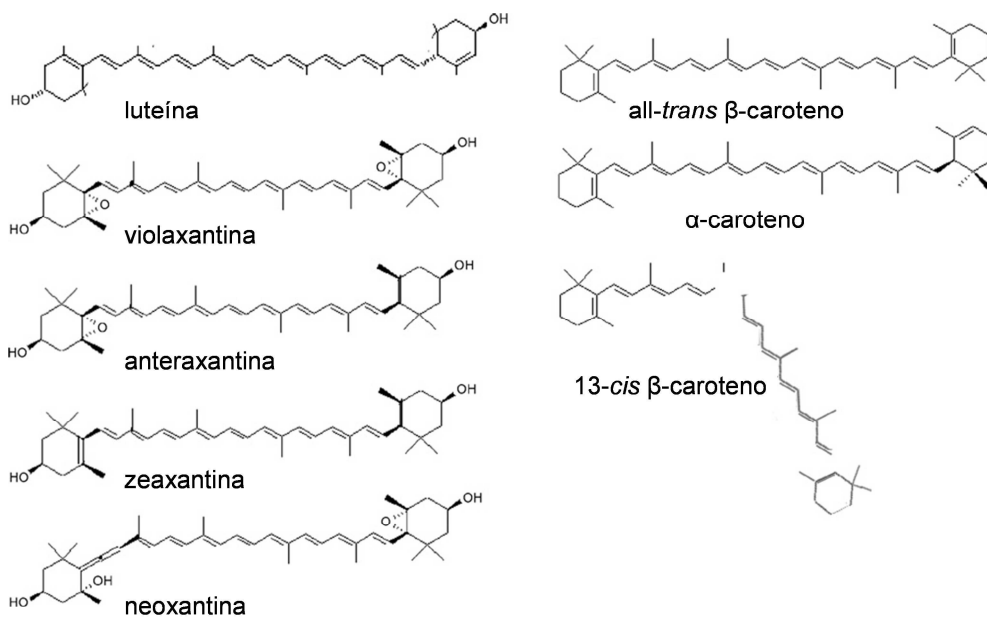


Figura 1. Estructura química de los principales carotenoides encontrados en el forraje (adaptado de Nozière *et al.* (2006a).

Los dobles enlaces conjugados presentes en los carotenoides son los responsables de la intensa coloración de los alimentos que contienen estos pigmentos, por ejemplo, los colores naranja de la zanahoria y rojo del tomate, se deben a la presencia de β-caroteno y licopeno, y el color amarillo se debe a la luteína respectivamente (Figura 1). Debido a su estructura, los carotenoides están sujetos a muchos cambios químicos inducidos por

las distintas condiciones de procesamiento que se emplean en la industria alimentaria (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

Su síntesis sólo la pueden realizar las plantas y algunos microorganismos, por lo que su presencia en el tejido animal siempre procede de la ingestión de forraje. La ingestión, absorción, metabolismo y deposición de los carotenoides en el tejido animal varía en función del tipo de alimento ingerido (forrajes o pienso) y la especie animal. A su vez, numerosos factores afectan al contenido en carotenos de las plantas. En condiciones húmedas, el contenido en carotenos es más elevado que cuando la planta crece en condiciones de secano (Lindqvist *et al.*, 2012), lo que es consecuencia de menor relación hoja:tallo (Ballet *et al.*, 2001). También afecta el momento del día de la cosecha, la temperatura y la luz ambiental (Lindqvist *et al.*, 2012); y el procesado de conservación (Nozière *et al.*, 2006a). Por ello se debe considerar que las condiciones climáticas y el momento del muestreo puede afectar la cantidad de carotenos en el forraje (Ballet *et al.*, 2001).

Con respecto a la especie animal, dentro de los rumiantes hay diferencias en el metabolismo de los carotenoides. El vacuno transporta mayor cantidad de carotenoides totales en el plasma que el ovino, principalmente en forma de β -caroteno y una menor proporción de luteína, mientras que el ovino sólo los transporta en forma de luteína (Yang *et al.*, 1992), por lo que el vacuno y el ovino no son comparables (Nozière *et al.*, 2006a).

2.1.2. La vitamina A

La vitamina A tiene una estructura compuesta por un anillo b-ionona hidrófobo y una cadena lateral isoprenoide conjugada que contiene un grupo polar en su extremo (Figura 2). El término genérico "vitamina A" incluye cualquier compuesto que posee la actividad biológica de all-*trans*-retinol. El término "retinoides" incluye tanto las formas naturales de la vitamina A, como muchos análogos sintéticos de retinol, con o sin actividad biológica. Las diferentes formas de vitamina A (Figura 2) que se encuentran en tejidos animales son retinol, retinal, ácido retinoico y ésteres de retinilo (ER) (Debiec *et al.*, 2005). El contenido en retinol en los tejidos también depende de la especie de rumiante que se estudia. No hay diferencias en el contenido de retinol en el plasma pero si en la cantidad depositada en el hígado, siendo mayor en el ovino que en el vacuno (Yang *et al.*, 1992).

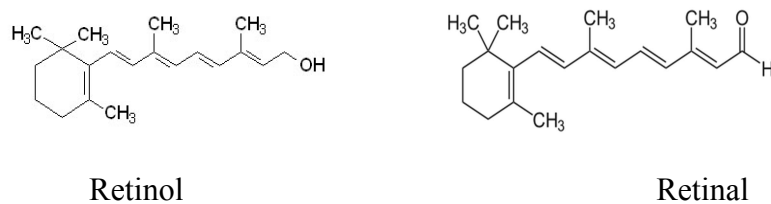


Figura 2. Estructura química de la vitamina A

2.1.3. La vitamina E

Es uno de los más abundantes agentes antioxidantes liposolubles que se encuentran en el plasma y las células de los mamíferos superiores. Esta vitamina existe como formas de tocoferoles y tocotrienoles, los tocoferoles tienen una cadena saturada y los tocotrienoles una insaturada con 3 dobles enlaces (Figura 3).

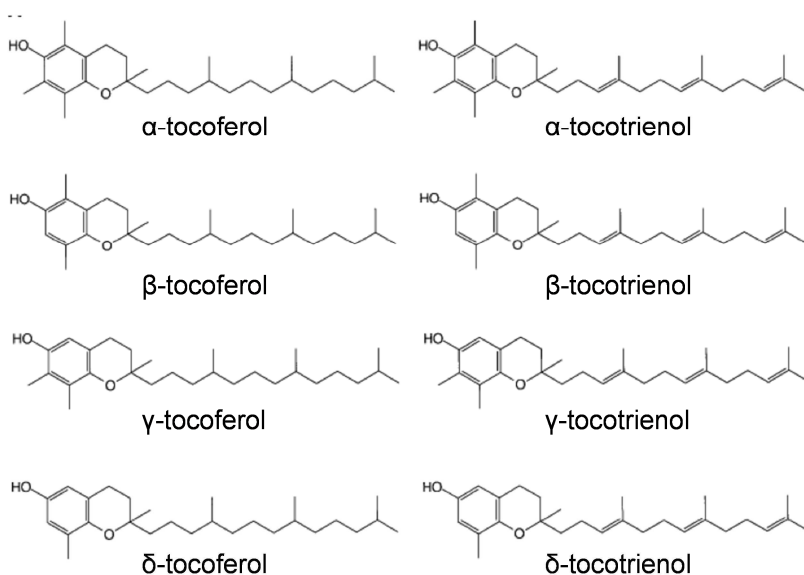


Figura 3. Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles.

Los tocoferoles están generalmente presentes en todas las plantas y en casi todas las partes de la planta, los tocotrienoles solo están presentes en un específico grupo de plantas y se encuentran exclusivamente en las semillas y frutas. La presencia y la distribución de tocotrienoles en las semillas sugieren que cumple funciones específicas que difieren de la función de los tocoferoles en las hojas (Falk y Munné-Bosch, 2010).

Los tocoferoles son antioxidantes lipofílicos que se sintetizan exclusivamente en los organismos fotosintéticos. En la mayoría de las plantas superiores la α - y γ -tocoferol son predominantes y representa unas de las formas más activas de la vitamina E (aproximadamente 90%), encontrada en los tejido animales (Zingg, 2007).

En las plantas la concentración de vitamina E dependen de factores tales como: el estado de madurez de la planta, la temperatura, tiempo de conservación y la proporción de hoja en el forraje y cosechado (Nozière *et al.*, 2006a). Se encuentra principalmente en forma natural en los aceites vegetales (soja, maíz, girasol, algodón...), semillas y hojas y partes verdes de las plantas (Sayago *et al.*, 2007), pero también la podemos encontrar como suplemento dietético.

2.2. Metabolismo de los biomarcadores

2.2.1. Absorción.

La vitamina A en la dieta se origina como retinol a partir de tejidos animales o como pro-vitamina A (principalmente β -caroteno) a partir de tejidos vegetales. La conversión de β -caroteno en vitamina A implica la acción de dos enzimas la β -caroteno-15,15'-dioxigenasa, que cataliza la escisión de β -caroteno en el centro del doble enlace para producir dos moléculas de retinal y la enzima reductasa de retinoaldehído para reducir el retinal en retinol, donde es absorbido por difusión facilitada por los enterocitos de la mucosa intestinal (Blomhoff y Kiil, 2006).

La capacidad de absorción de los carotenoides de la dieta varía mucho entre especies. En algunas especies tales como rata, cerdo, cabra, oveja, conejo y búfalo, los carotenoides de la dieta son absorbidos por los quilomicrones de la mucosa intestinal, donde la mayor parte se convierte en retinol. En los seres humanos, vacas, caballos cantidades significativas pasan en la sangre vía linfa y por lo tanto a los tejidos extra-hepáticos y tejidos adiposos, donde están almacenados (Olson, 1989). Además hay otros factores que afectan la eficacia de la absorción de retinol y β -caroteno, como es el tipo de enlace, siendo la forma *trans* mejor absorbido que la forma *cis* (Stahl *et al.*, 1995), o la cantidad y la calidad de la grasa presente en la dieta (Blomhoff *et al.*, 1991).

La absorción de vitamina E está relacionada con la digestión de la grasa y se ve facilitada por la bilis y la lipasa pancreática (McDowell, 2000). El sitio principal de absorción parece ser el intestino delgado donde se absorbe principalmente en forma de alcohol. Los ésteres son hidrolizados en gran medida en la pared intestinal, mientras que el alcohol entra en los quilíferos intestinales y se transporta a través de la linfa a la circulación general (Traber y Arai, 1999). La absorción de vitamina E por los enterocitos parece ocurrir por difusión pasiva (Bjørneboe *et al.*, 1990), que depende en gran parte por la cantidad y la calidad de la grasa en la dieta (Bjørneboe *et al.*, 1990,

Bramley *et al.*, 2000) . Los triglicéridos de cadena media particularmente aumentan la absorción, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados son inhibidores. Solo tras el paso por el hígado, el α -tocoferol aparece preferentemente en el plasma (Traber, 1996), mientras que las demás formas se secretan en la bilis o bien se excreta en la heces (Drevon, 1991). La absorción varía considerablemente entre los tejidos, siendo muy rápida en el hígado, pulmón, bazo, riñón y eritrocitos, mientras que se produce a velocidades muy lentas en el tejido cerebral y adiposo

2.2.2. Transporte.

La vitamina A se transporta a través del sistema linfático con la ayuda de una lipoproteína de baja densidad al hígado, donde se deposita principalmente en los hepatocitos y en las células estrelladas y parenquimatosas (Debier *et al.*, 2005). Durante este proceso una parte puede ser tomada por los tejidos extra-hepáticos tales como los pulmones, los riñones, el bazo, músculo esquelético, adiposo y la médula ósea, y la otra parte se almacena en el hígado donde seguirá el metabolismo del retinol (Blomhoff *et al.*, 1991, Blaner, 1994, Blomhoff y Kiil, 2006). El éster de retinol almacenado en las células estrelladas del hígado, es convertido el retinol por la enzima retinil éster hidrolasa y liberado en la circulación. La movilización de la vitamina A en el hígado es un proceso altamente regulado. Más del 90% de retinol plasmático total es transportado en la circulación sanguínea unido a proteínas de transporte del retinol (Olson, 1989, Blomhoff *et al.*, 1991).

En el caso de los carotenoides no existe una proteína específica de transporte en el plasma, van al torrente sanguíneo asociados a la lipoproteína de muy baja densidad, ya que son liposolubles (Blomhoff y Kiil, 2006). Las concentraciones plasmáticas de retinol por lo general se mantienen relativamente constantes independientemente del tipo de dieta, siempre que existan reservas en hígado, siendo similares y extrapolables entre ovino y vacuno (Yang *et al.*, 1992). Sin embargo en los tejidos corporales, los depósitos en el ovino y en el vacuno son distintos, depositando el ovino mayor cantidad de retinol en hígado. Un exceso de vitamina A o de carotenoides en la dieta puede tener efectos negativos principalmente sobre el hígado, piel, huesos y sistema nervioso central (Hathcock *et al.*, 1990).

Al igual que los carotenoides, la vitamina E no tiene una proteína específica de transporte, circulando en forma de alcohol (tocoferol) en las lipoproteínas del plasma,

junto con otros lípidos, y los eritrocitos. El α -tocoferol del hígado es secretado al torrente sanguíneo y transportado por lipoproteínas de muy baja densidad y absorbido a través de receptores LDL (lipoproteína de baja densidad) a los otros tejidos (Debier *et al.*, 2005). El α -tocoferol se almacena principalmente en el tejido hepático que junto con el tejido adiposo y con el músculo esquelético suman aproximadamente el 90% del total de α -tocoferol almacenado (Bjørneboe *et al.*, 1990).

2.2.3. Funciones

En la nutrición humana y animal, la vitamina A desempeña un papel importante en muchos procesos biológicos esenciales tales como la visión, la inmunidad, la reproducción y como antioxidante. McDowell (2000) sostiene que la deficiencia de vitamina A, causa pérdida de la visión, debido a un fallo de la formación de la rodopsina en la retina; defectos en el crecimiento del hueso, defectos en la reproducción y defectos en el crecimiento y la diferenciación de los tejidos epiteliales, que con frecuencia conlleva la queratinización de los tejidos. La queratinización de estos tejidos provoca una pérdida de la función en los aparatos digestivo, genital, reproductivo, respiratorio y urinario. Recientemente se ha relacionado la función antioxidante de los carotenoides con varios tipos de cáncer (por ejemplo cáncer de pulmón y de piel) (Stahl *et al.*, 1994). La actividad antioxidante de la vitamina A y carotenoides es conferida por la cadena poliénica hidrófoba que puede apagar el oxígeno y nitrógeno reactivo (Palace *et al.*, 1999, Stahl y Sies, 2005) que se genera durante el metabolismo aeróbico y procesos patológicos evitando de esta forma el daño de moléculas biológicamente importantes, como lípidos, ADN o proteínas y están implicados en muchas enfermedades degenerativas (Sies, 1986, Halliwell, 1996).

La vitamina E también tiene muchas funciones biológicas como por ejemplo: actividad enzimática, función en la expresión génica, la función neurológica y la más importante la función antioxidante. La forma principal de la vitamina E, α -tocoferol, representa la mayor parte de la actividad antioxidante, que rompe la cadena soluble en grasa en los tejidos y plasma de los mamíferos (Bramley *et al.*, 2000) y protege a los ácidos grasos poli-insaturados de las membranas celulares y lipoproteínas de la oxidación en hidroperóxidos (Packer, 1991). La actividad antioxidante de α -tocoferol ocurre cuando éste dona su átomo de hidrógeno fenólico a un radical lipídico peroxil para formar un hidroperóxido que se convierte en un radical tocoferoxilo. La relativa estabilidad de esta molécula previene la propagación de reacciones con radicales libres. Esta forma de

donación de electrones parece ser el principal factor que determina la eficiencia antioxidante relativa, con α -tocoferol como el más potente donador de hidrógeno seguido por γ -, β - y δ - (Falk y Munné-Bosch, 2010).

2.3. Presencia de carotenoides, retinol y tocoferol en los alimentos

2.3.1. Forrajes

A pesar de la gran variedad de carotenoides en las plantas, no más de 10 se encuentran en los alimentos de los rumiantes, donde los más importantes cuantitativamente son el β -caroteno, luteína, zeaxantina y epiluteína. Por otro lado, la mayor parte del α -tocoferol y β -caroteno en el forraje se encuentra en las hojas (Brown, 1953), y las especies de plantas con el ratio hoja/tallo alto por lo general tienen un mayor contenido α -tocoferol y β -caroteno (Thafvelin y Oksanen, 1966, Livingston *et al.*, 1968b).

El β -caroteno se oxida fácilmente una vez que se cortan las plantas, resultando en concentraciones menores de β -caroteno en el forraje almacenado que en forraje fresco (Bruhn y Oliver, 1978, Kalač y McDonald, 1981, Park *et al.*, 1983). Dian *et al.* (2007) demuestra en sus estudios que la deshidratación también puede provocar pérdidas en carotenoides, llegándose a producir un 30% de pérdidas de β -caroteno y tocoferol en el proceso de deshidratación de la alfalfa, estando ello de acuerdo con Livingston *et al.* (1968a). En misma línea, Lindqvist *et al.* (2012) observaron, en un trabajo donde se compara el efecto del secado y del ensilado sobre el contenido de α -tocoferol y β -caroteno de varias especies forrajeras, que las plantas secadas al sol tenían pérdidas de hasta 80-90% y que el proceso del ensilar supuso unas pérdidas de hasta 40-50%. Nozière *et al.* (2006a), señalaron que los ensilados bien fermentados tienen pérdidas de β -caroteno inferiores al 20%, sin embargo Kalač (1983), sostiene que las pérdidas de carotenoides y tocoferoles varían más en función de la especie forrajera y menos en función del tratamiento aplicado.

2.3.2. Piensos

La mayoría de los piensos de los rumiantes presentan un bajo contenido en carotenoides. El maíz contiene luteína y zeaxantina, y cantidades menores de otras xantofilas, como criptoxantina, zeinoxantina, que se concentran en la harina de gluten de maíz. La vitamina E se encuentra principalmente en algunos aceites, como por ejemplo el aceite de germen de trigo que contiene cantidades muy elevadas, más de 100 mg/100 g, el aceite de girasol que contiene entre 50 y 60 mg/100 g de semilla cruda o el

aceite de oliva que contiene entre 10 y 15 mg/100 g. Sin embargo, los piensos con granos de cereales y las oleaginosas no suele contener carotenoides ni vitamina E dado que se ha sometido a calor, destruyendo la vitamina E inicialmente presente en el grano.

Se fabrican piensos enriquecidos con vitamina E, normalmente contienen acetato dl- α -tocoferil, que es más estable que los compuestos de alcohol y por consiguiente las pérdidas en la actividad biológica por el proceso de fabricación y de almacenamiento son más bajas. Se emplean estos piensos enriquecidos durante el periodo de acabado de los corderos y terneros para aumentar las concentraciones de α -tocoferol en músculo, con el fin retrasar el deterioro de la carne y la oxidación de las grasas (Lopez-Bote *et al.*, 2001, Lauzurica *et al.*, 2005, Ripoll *et al.*, 2007, González-Calvo *et al.*, 2014). A pesar de los resultados beneficios obtenidos en estos estudios, el enriquecimiento de los piensos con vitamina E aumenta los costes de producción. Una alternativa más económica y viable para aumentar la vida útil de la carne es el pastoreo con alfalfa, a través de una mayor deposición de tocoferol de manera natural (Ripoll *et al.*, 2013).

Recientemente se está estudiando la incorporación de taninos condensados a los piensos del ovino. Los taninos son compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, por lo que se les incluye dentro de los metabolitos secundarios (Launchbaugh *et al.*, 2001). Con la incorporación de los taninos condensados al pienso se busca modificar la fermentación ruminal porque pueden inhibir el crecimiento de varias bacterias ruminales, incluyendo las asociadas con el proceso de biohidrogenación ruminal, para reducir las emisiones de efecto invernadero (Toral *et al.*, 2013). En el rumen, los taninos condensados eliminan las propiedades espumantes de las proteínas de leguminosas forrajeras y reduce la tasa de gas producido durante la fermentación (Launchbaugh *et al.*, 2001). La actividad antimetanogénica de los taninos condensados se atribuye que disminuyen la producción de metano a través de una reducción en la digestión de la fibra. Sin embargo, los efectos no están claros ya que dependen de la cantidad y tipo de taninos condensados incorporados a la dieta. Concentraciones entre 2–4% MS afectan positivamente al metabolismo proteico, al reducir la degradación a nivel ruminal y aumentar el flujo de aminoácidos que pueden ser absorbidos en el intestino delgado y mejorando el crecimiento animal sin afectar el consumo de alimento. Sin embargo, una inclusión en la dieta superior al 6% reduce el consumo de alimento, la tasa de digestión ruminal y productividad (Frutos *et al.*, 2004).

Dada la capacidad de modificación de la fermentación ruminal, se está estudiando su uso para modificar el perfil de ácidos grasos de la leche (Cabiddu *et al.*, 2009) y la carne (Priolo *et al.*, 2005). El efecto de los taninos condensados sobre el perfil de ácidos grasos es diferente según si se incorporan a la dieta a través de forrajes que contienen taninos condensados (Addis *et al.*, 2005, Cabiddu *et al.*, 2009) o con quebracho (Toral *et al.*, 2011, Toral *et al.*, 2013). En cuanto al efecto de los taninos condensados sobre el perfil de ácidos grasos de la carne, la magnitud del efecto depende del forraje dado a los corderos (Priolo *et al.*, 2005, Vasta *et al.*, 2007). A su vez, parece ser que la capacidad antioxidante de los taninos condensados permite alargar la vida útil de la carne (Luciano *et al.*, 2009, Luciano *et al.*, 2011).

2.4. Presencia de carotenoides, retinol, α -tocoferol en los productos animales

2.4.1. Según la especie animal

Existen diferencias entre especies de rumiantes con respecto al contenido de carotenoides en los productos animal (Yang *et al.*, 1992, Nozière *et al.*, 2006a). Los carotenoides, principalmente β -caroteno, en vacuno la conversión del β -caroteno en retinal se hace principalmente en el hígado lo que permite a que una gran parte pase directamente a los tejidos extra hepáticos mientras que en ovina la conversión del β -caroteno en retinal se hace en el intestino delgado lo que hace llegar menos β -caroteno al hígado y por lo tanto a los tejidos extrahepáticos (Debier y Larondelle, 2005).

En general, la grasa corporal de las ovejas y las cabras se mantiene blanca, independientemente de la dieta, mientras que la grasa corporal del ganado vacuno puede variar de color blanco cremoso a amarillo-naranja brillante, dependiendo de la dieta y su contenido en carotenoides. Esta diferencia en el color de la grasa entre especies se debe a que el vacuno deposita en la grasa mayor cantidad de carotenoides que el ovino y caprino (Yang *et al.*, 1992). Además, existen diferencias en el tipo de carotenoide depositado, el vacuno deposita principalmente β -caroteno y en menor cantidad luteína, mientras que el ovino y caprino únicamente depositan pequeñas cantidades de luteína.

La leche de cabra y de oveja contiene retinol y luteína y generalmente no contiene β -caroteno mientras que la de vaca presenta retinol, luteína y β -caroteno (Gentili *et al.*, 2012). Las diferencias entre ovino y vacuno encontradas en la leche, también aparecen en el plasma, únicamente se encuentra luteína en el plasma ovino mientras que en el de vacuno se encuentra luteína y β -caroteno (Yang *et al.*, 1992). Sin embargo, en un

estudio reciente, Álvarez *et al.* (2014) ha encontrado tanto luteína como β -caroteno en el plasma de los corderos.

En relación con la vitamina E, hay varios estudios (McDowell, 2000, Gentili *et al.*, 2012) que indican que los subproductos animales, en general contienen solo pocas cantidades de vitamina E y que la leche y los productos lácteos son a menudo fuentes pobres de esta vitamina. Esto siendo resultado de la mala absorción o retención en el cuerpo, siendo siempre relacionado con las necesidades de cada animal. A medida que la ingestión de vitamina E aumenta por causa de una suplementación, baja la absorción de α -tocoferol lo que sugiere un proceso de saturación (McDowell, 2000).

2.4.2 Según la alimentación recibida

2.4.2.1. En el suero o plasma

Las concentraciones plasmáticas maternas de retinol y α -tocoferol por lo general disminuyen desde finales de la gestación hasta el parto, alcanzando su nivel mínimo alrededor del nacimiento y volviendo hacia los valores basales a las pocas semanas de la lactación (Goff y Stabel, 1990, LeBlanc *et al.*, 2004, Debier *et al.*, 2005), el fenómeno está al menos en parte atribuido a la alta acumulación de estos nutrientes en el calostro.

Los estudios de Kumagai (1995), nos indica que la suplementación vitamina A y E en ovejas durante el periodo de gestación, hace aumentar las concentraciones de retinol y α -tocoferol en el hígado mientras que en el plasma las concentraciones se mantienen constantes. Bates (1983) y Peirce (1945), a pesar de encontrar diferencias entre los animales que recibían suplementación con Vitamina A de los que no recibían, concluyeron que las concentraciones de retinol en el plasma no refleja una baja ingesta de vitamina A excepto cuando las reservas hepáticas se han agotado.

En corderos, González-Calvo *et al.* (2014), estudiaron el efecto del periodo de alimentación con pienso enriquecido con 500UI de α -tocoferol sobre la concentración de vitamina E en plasma y observaron que las concentraciones de α -tocoferol en el plasma de los corderos variaba al inicio de la suplementación alcanzando un punto de saturación a partir del cual la concentración se estabilizaba.

En relación a la vitamina A, por el contrario, (Arnett *et al.*, 2007) observaron en un estudio de suplementación con vitamina A en dietas de corderos que la inclusión de esta vitamina no afectó su contenido en plasma durante los primeros 28 días, momento a partir del cual se inició un incremento de dicho contenido, observándose diferencias

significativas a partir del día 56, y manteniéndose hasta el día 112 del experimento. Cuando se producía una reducción del retinol aportado en la dieta la reducción en el retinol en plasma se observó 26 días después. Según los mismos autores, la respuesta a dicho comportamiento puede ser debida a la movilización de las reservas hepáticas de retinol (Arnett *et al.*, 2007).

En la misma línea (Yang *et al.*, 2002) encontraron que la suplementación con 2500 UI tocoferol en terneros, incrementó de manera acusada el contenido en α -tocoferol en el plasma de los terneros alimentados con pienso mientras que durante la mayor parte del ensayo la suplementación no afectó la concentración de α -tocoferol en los terneros en pastoreo y tampoco se vio afectada la concentración de β -caroteno. Únicamente incrementó ligeramente la concentración de α -tocoferol en el plasma al final del ensayo en los terneros en pastoreo. En un estudio similar, Descalzo *et al.* (2005) estudiaron la suplementación con 500 UI de tocoferol a terneros en pastoreo y en terneros alimentados con pienso. Los resultados mostraron que la suplementación con tocoferol modificó la concentración de α -tocoferol en el plasma de los terneros alimentados con pienso pero no afectó la concentración de β -caroteno en el plasma de los terneros independientemente del tipo tratamiento.

Comparando dos tipos de alimento (ensilado de hierba vs. heno de pasto), con distintos grupos de vacas, Nozière *et al.* (2006b) observaron que los valores plasmáticos tanto de retinol y carotenoides como de α -tocoferol manifestaron concentraciones mayores en los animales alimentados con ensilado que en los de heno, lo que es una respuesta directa a la mayor ingestión de dichos compuestos en el ensilado de hierba.

2.4.2.2. En la leche

La vitamina A y E a pesar de su vital importancia para el recién nacido, poco se sabe sobre la transferencia de estos compuestos a la glándula mamaria (Debier y Larondelle, 2005).

Los recién nacidos contienen niveles bajos de β -caroteno, retinol y α -tocoferol en sus tejidos y el plasma sanguíneo debido a una transferencia placentaria muy limitada de la madre al feto. Por eso la ingestión de vitaminas A y E a través de calostro puede contribuir a una mejora de las defensas de los recién nacidos y para unas funciones metabólicas adecuadas (Blum *et al.*, 1997).

Sobre el efecto de la alimentación sobre la concentración de retinol y α -tocoferol en la leche de oveja Álvarez *et al.* (2014), encontró que las ovejas de pasto presentaron más retinol y α -tocoferol en la leche comparando con la leche de las ovejas que consumían concentrado donde no se han encontrado vitaminas, lo que es resultado de la ausencia de esto compuesto en los concentrados como consecuencia de los procesos de fabricación.

Weir *et al.* (1949), estudiando el efecto del contenido en carotenos de la dieta sobre la concentración de retinol en sangre, leche e hígado de las ovejas y corderos, concluyeron que con las dietas constituidas por heno de alfalfa los animales presentaban mayor contenido en retinol en plasma que con las dietas de paja pobre en carotenos. Sin embargo, el contenido en retinol en el calostro (durante la primera semana post parto) fue siempre alto, independientemente de la dieta que recibían las ovejas.

Comparando la composición de vitamina A y E en la leche y en los productos lácteos en función del sistema de alimentación de los animales Martin *et al.* (2004), encontró que en vaca y cabras alimentadas con pasto o con ensilado de raigrás la leche presentaba mayor contenido en retinol y α -tocoferol en comparación con la leche de los animales alimentados a base de concentrado o ensilado de maíz. En general el ensilado de maíz ha sido considerado una fuente pobre de carotenoides si lo comparamos con ensilado de otros cultivos, especialmente si se produce a partir del maíz dañado por las heladas (Pavel, 2013).

Además de la alimentación existen varios factores que influyen en la composición de vitaminas liposolubles en la leche como por ejemplo: la raza, la estación del año, en número de partos y el propio individuo (Nozière *et al.*, 2006a)

2.4.2.3. En el músculo

Molino *et al.* (2014) encontraron que los corderos lechales alimentados juntos con sus madres en pasto de alfalfa, presentaron mayor contenido en α -tocoferol en el musculo que los corderos lechales cuyas madres fueron estabuladas y alimentadas con heno. En el mismo estudio se observó que el pastoreo en alfalfa tuvo mejor impacto sobre las concentraciones de α -tocoferol en el músculo *Semitendinosus* que en el músculo *Longissimus Dorsi*.

Yang *et al.* (2002) estudiando en vacuno los niveles de α -tocoferol y β -caroteno en tres músculos, *Longissimus dorsi*, *Semimembranosus* y *Gluteus medius*, observaron que el

Gluteus medius tendía a presentar mayores contenidos que los restantes, aunque las diferencias no fueron muy significativas.

Según los mismos autores, la suplementación con tocoferol redujo la deposición del β -caroteno en los músculos en los animales en pastoreo pero no modifica la deposición de β -caroteno en los animales de pienso, aun así las cantidades depositadas fueron siempre superiores en los animales de pastoreo que en los de pienso.

En la misma línea Descalzo *et al.* (2005), observaron que la suplementación con 500 UI de tocoferol en los animales en pastoreo no afectó a la concentración de β -caroteno y α -tocoferol en el músculo *Psoas major*.

La incorporación de taninos condensados en el pienso podría afectar a los contenidos en carotenoides, tocoferol y retinol en los distintos productos animales por su capacidad antioxidante. Sin embargo, no hay estudios que se centren en este tipo de relaciones. En carne se ha encontrado que la incorporación de taninos condensados del quebracho incrementó los fenoles en el músculo y se alargó la vida útil de la carne (Luciano *et al.*, 2011), pero no aportan datos de tocoferol y/o carotenoides. La inclusión de taninos condensados en la dieta de corderos mediante la incorporación de extracto de uva no modificó la deposición de α -tocoferol en el músculo (Muíño *et al.*, 2014). La falta de respuesta a dicha inclusión pudo ser debido a la baja dosis de extracto de uva, la cual no fue suficiente para incrementar el depósito de polifenoles en la carne.

3. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como principal objetivo el estudio de determinados componentes (carotenoides y vitamina E) que pueden actuar como biomarcadores del tipo de alimentación recibida. Se pretende buscar vías de control que permitan por un lado clasificar el producto animal según la alimentación recibida y por otro lado ofrecer al consumidor la información que están exigiendo.

Los objetivos concretos del proyecto son los siguientes:

1. Análisis de la presencia de carotenoides y tocoferoles como biomarcadores de los alimentos de las ovejas
2. Estudiar el efecto del tipo de forraje de la dieta (pasto vs. heno) y de la adición de taninos condensados al pienso de la oveja sobre la presencia de carotenoides, retinol y α -tocoferol en la leche y en el plasma de la oveja y del plasma y de la carne de sus lechales

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Localización

El ensayo con los animales se realizó en la finca experimental de “La Garcipollera” propiedad del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA). El sacrificio de los corderos, el estudio de la canal y la carne y los análisis químicos se realizaron en el matadero experimental y en el laboratorio de valoración nutritiva que el CITA tiene en Montañana (Zaragoza).

La finca experimental “La Garcipollera” está situada en Bescós de la Garcipollera (Jaca) ($42^{\circ}37'N$, $0^{\circ}30'O$), en el Pirineo oscense (Figura 4). Las instalaciones permanentes se encuentran a 945 m de altitud, se encuentra en la parte baja del valle del río Ijuez (afluente del río Aragón), a una distancia de 180 km de las instalaciones que tiene el CITA en Montañana (Zaragoza)

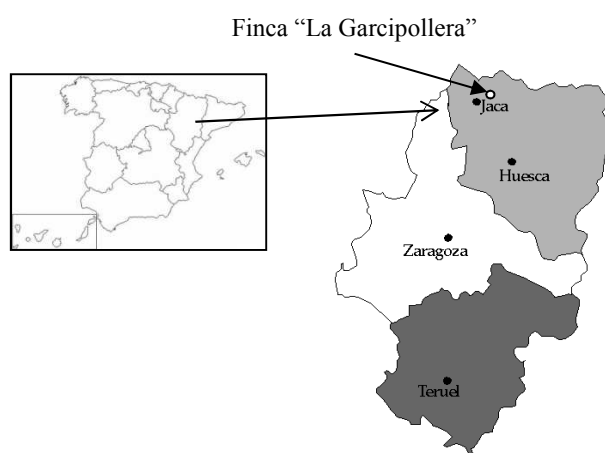


Figura 4. Localización geográfica de la estación experimental de “La Garcipollera”.

El clima es de montaña mediterránea, con inviernos fríos y prolongados y veranos secos y cálidos (Creus Novau, 1983) (Figura 5). La precipitación anual media del año 2014 fue de 1059 ± 192 mm con máximos en primavera y otoño - principio de invierno, pudiendo ser durante el invierno en forma de nieve, mientras que en verano suelen presentarse en forma de tormentas, describiéndose épocas de subaridez (Creus Novau, 1983).

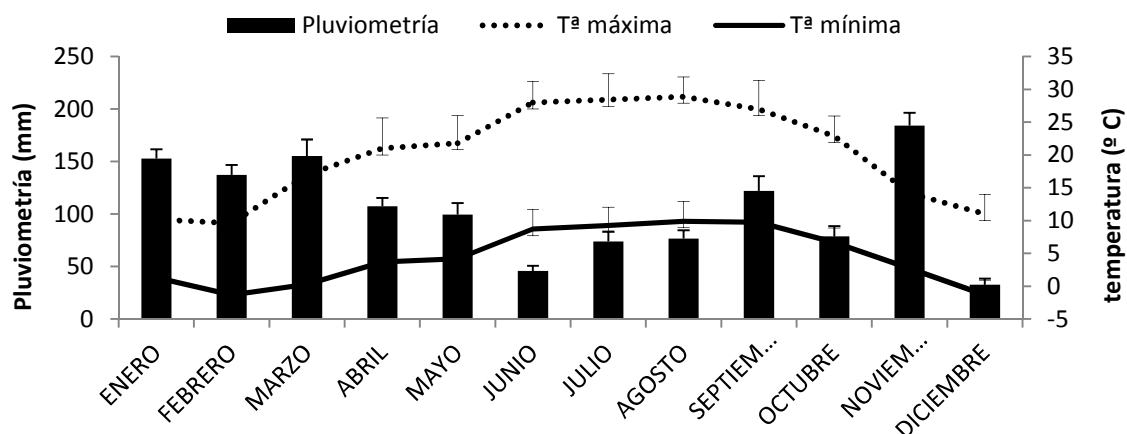


Figura 5. Pluviometría y temperaturas máxima y mínima registrados el año 2014.

4.2. Superficies forrajeras

El estudio se realizó en prados de fondo de valle, en los que predominan *Festuca arundinacea*, *Poa pratensis*, *Trifolium repens* y *Dactylis glomerata*. Dichos prados se utilizan tradicionalmente para la producción de heno para el invierno y en momentos puntuales se aprovechan a diente antes de la subida o después de la bajada de puerto (Casasús, 1998).

4.3. Manejo del rebaño experimental

El rebaño experimental constaba de 250 ovejas de raza Churra Tensina. El CITA inició el estudio de dicha raza en los años 90 por ser considerada una raza rústica de las más primitivas de la península. Forma parte del grupo de razas autóctonas más importantes de España, por su alta especialización en la producción de leche y por la calidad de su lechazo (MAGRAMA, 2009)

El sistema de explotación de la finca es el siguiente: de octubre a junio las ovejas permanecen en pastoreo permanente en praderas de fondo de valle y zonas boscosas adyacentes, teniendo acceso libre al cobertizo (Álvarez-Rodríguez, 2005). Cuando decrece la producción forrajera y/o aumentan las necesidades de los animales (épocas de partos), las ovejas son suplementadas con alfalfa deshidratada en aprisco (Casasús *et al.*, 1996). A principios de julio, tanto ovejas adultas como corderas de reposición se trasladan a los puertos, donde permanecen hasta octubre, mes en el que vuelven a las praderas de valle. La estabulación permanente únicamente se realiza en la época de partos de las ovejas (Casasús *et al.*, 1994).

El objetivo del manejo reproductivo es la obtención de un parto y repesca por oveja y año. Para ello se tiene un período de cubriciones de aproximadamente 45 días desde la bajada de puerto (fin de octubre) hasta diciembre, consecuentemente los partos se dan a inicios de primavera (marzo-abril). Los corderos pastan con las madres y disponen de acceso libre a una tolva con pienso situado en la pradera. Los corderos no destinados a reposición se venden en el mes de junio. Las corderas de reposición suben a puerto con sus madres, destetándose en octubre (Casasús *et al.*, 1994).

4.4. Animales y dietas experimentales

Se han utilizado ovejas de la raza Churra-Tensina, raza originariamente lechera, bien adaptada al Pirineo y que actualmente tiene un gran interés para la producción de corderos tipo lechal en zona montañosa como es el Pirineo oscense.

En el ensayo se utilizaron 39 ovejas y sus corderos desde el nacimiento hasta el sacrificio de estos con un peso vivo de 10-12 kg. Se ha utilizado un diseño 2 x 2 con el manejo de la oveja (pastoreo vs. estabulado) y la adición de taninos condensados al pienso de la oveja (control vs. con taninos condensados). Las ovejas y corderos se distribuyeron en lotes equilibrados según el peso y condición corporal de las ovejas en el momento del parto y el peso y fecha de nacimiento de los corderos.

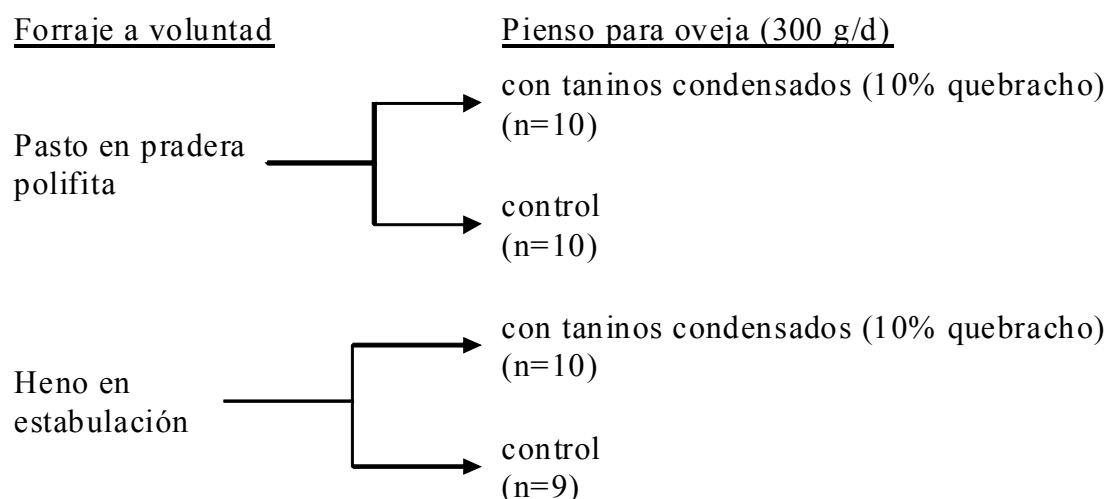


Figura 6. Esquema del diseño experimental

La mitad de las ovejas y sus corderos se asignaron al pastoreo. Se dividieron los animales en dos lotes, que fueron alojados en dos praderas adyacentes. Los animales tuvieron acceso durante todo el día al pasto. La pradera estaba compuesta principalmente por 67-95% de gramíneas (*Festuca arundinacea*, *Festuca pratensis* y

Dactylis glomerata), 30-4,4% de leguminosas (principalmente *Trifolium repens*) y 2-29% de otras especies (*Rumex acetosa* y *Ranunculus bulbosus*) (Joy *et al.*, 2008). El resto de ovejas y sus corderos fueron estabulados en 2 corrales adyacentes. Las ovejas recibieron heno de pradera y agua a voluntad.

Un lote de ovejas en pastoreo y otro lote de las estabuladas recibieron pienso control (sin taninos condensados) mientras que los otros lotes de ovejas en pastoreo y estabuladas recibieron pienso con 10% de quebracho (75% taninos condensados). Los piensos se formularon para ser isoenergéticos e isoproteicos. Los ingredientes de los piensos y la composición de los alimentos están detallados en la Tabla 1. Todas las ovejas recibieron diariamente 300 g de pienso por cabeza.

Tabla 1. Composición de los alimentos ingeridos por las ovejas

	Pradera	Heno	Pienso Control	Pienso con taninos condensados
Ingredientes				
Cebada	-	-	33,53	48,72
Salvado de trigo (20% almidón)	-	-	20	5,98
Gluten feed de maíz (19% PB)	-	-	18	15
Harina de soja	-	-	-	12,08
Harina de girasol (28% PB)	-	-	10	-
Maíz nacional	-	-	10	5
Extracto de quebracho	-	-	-	10
Harina de girasol (34% PB)	-	-	2,35	-
Alfalfa granulada (15,2% PB)	-	-	2	-
Melaza de caña	-	-	1	-
Sal	-	-	0,5	0,5
Grasa mezcla	-	-	0,2	0,54
Corrector	-	-	0,2	0,2
Surfactante (Maxi_Mill)	-	-	0,05	0,05
Composición química, g/kg MS				
Humedad	828,13	110,55	110,08	113,63
Cenizas	118,61	78,02	62,21	62,57
Proteína bruta	239,27	69,25	140,61	140,05
Fibra neutro detergente	446,30	632,84	175,27	248,8
Fibra ácido detergente	185,37	338,5	59,8	69,43
Lignina ácido detergente	39,47	40,05	10,89	20,83

La experiencia duró desde el nacimiento de los corderos hasta su sacrificio con 10-12 kg de peso vivo. Una vez los corderos alcanzaron el peso objetivo, se trasladaron a las instalaciones del CITA en Montañana (Zaragoza) para ser sacrificados en el matadero

experimental, siguiendo la normativa sobre protección de animales de la UE (Directiva 93/119/CE, RD 54/1995). Tras el sacrificio, las canales permanecieron en una cámara de refrigeración a 4° C durante 24 horas.

4.5. Medidas realizadas

Alimentos. Semanalmente se tomaron 3 muestras de la pradera por tratamiento, 3 muestras del heno de pradera por tratamiento y dos del pienso de las ovejas para los posteriores análisis químicos. Parte de las muestras se desecaron a 60°C en estufa de ventilación forzada hasta alcanzar el peso constante. Seguidamente se molieron a través de un molino de cuchillas provisto de una malla de 1 mm de diámetro y se almacenaron identificadas hasta posterior análisis. Una segunda parte de la muestra fue almacenada a 4 °C hasta el día siguiente del muestreo. Se realizó el análisis de los carotenoides, y tocoferoles de los alimentos en fresco.

Plasma. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular de las ovejas y de los corderos en la fase inicial de la lactación (día $6 \pm 0,3$), media (día $20 \pm 0,4$) y final (día $31 \pm 0,5$). Se utilizaron tubos de vacío con Litio-heparina de 9 ml (Vacuette). Una vez extraídas, las muestras se protegieron de la luz para evitar una posible oxidación de los carotenoides. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 3500 r.p.m. y se tomaron alícuotas del plasma, que se congelaron a -20°C hasta posteriores análisis.

Leche. La producción de leche se estimó semanalmente mediante la técnica de la oxitocina propuesta por Doney *et al.* (1979) con ordeño mecánico y apurado a mano, con un intervalo entre ordeños de 4 h. Las ovejas recibieron 5 UI de oxitocina en la vena yugular antes del primer (8:00 h) y segundo ordeño (12:00 h). Entre ambos ordeños, los corderos fueron separados de sus madres y éstas dispusieron libremente de su dieta. La producción de leche obtenida en el segundo ordeño se pesó y su producción fue extrapolada al día completo. Se tomó una muestra individual de leche (50 ml) para ser almacenada en refrigeración hasta los futuros análisis químicos. Las muestras se conservaron en refrigeración (4°C) hasta su traslado al CITA de Montañana donde se congelaron a -20°C hasta el análisis.

Músculo. Tras el sacrificio y faenado de los corderos se registró el peso de la canal caliente (PCC), que incluía la cabeza, el epiplón, los riñones y el hígado, y que no incluía pulmones, corazón, diafragma y bazo. Seguidamente, almaceno durante 24h en cámara de refrigeración a 4° C y se dividió longitudinalmente la canal en dos. De la

media canal izquierda se extrajeron los músculos *Longissimus thoracis* y *Semitendinoso*, y posteriormente fueron divididos en muestras. Una de las muestras de ambos músculos se envasaron al vacío, se congelaron a -80° C y se liofilizaron (VirTis, Germany). Las muestras se pesaron antes y después de la liofilización para obtener el contenido en materia fresca de la carne. Tras la liofilización se mantuvieron congeladas, protegidas de la luz hasta los futuros análisis.

4.6. Métodos de análisis de los carotenoides, retinol y tocoferoles

Patrones, reactivos y soluciones utilizadas

- Patrones

- α -tocoferol
- γ -tocoferol
- δ -tocoferol
- β -caroteno
- Luteína
- Retinol

- Reactivos y soluciones

- Acetona
- Ascorbato de sodio
- Sodio sulfato anhidro
- Ácido ascórbico
- Hexano
- Solución de BHT de 25 μ g/ml en hexano. Se prepara semanalmente
 - Se pesan en una bandeja de plástico 0,01gr de BHT.
 - Se mide en un matraz aforado 400 ml de hexano.
 - Se introduce el BHT y el hexano en una botella con dosificador. Para evitar pérdidas de BHT se lava la bandeja con parte del hexano del matraz dejando caer la solución dentro de la botella.

- Etanol
- KOH
- Solución saponificante: 11% KOH (wt/v) en solución de 55% ETOH (v/v) y 45% de agua destilada deionizada. Esta solución se prepara semanalmente de la siguiente manera:
 - Se prepara la solución 55:45 ETOH: H₂O deionizada (220 ml de etanol y 180 ml de agua)
 - Se pesan en un vaso de precipitado 44 gr de KOH en pellets
 - Se añade parte de los 180 ml de agua destilada deionizada y se agita hasta la completa disolución del KOH.
 - Se añade el resto del agua y los 220 ml de etanol
 - Se trasvasa a un dosificador.

4.6.1. Métodos de extracción

En todos los métodos de extracción se intentaron proteger al máximo de la luz directa a los alimentos, leche, plasma y carne.

4.6.1.1. Alimento

Para la extracción de los carotenoides y tocoferoles de los alimentos se realizó la extracción líquida con solventes, siguiendo la metodología de Val *et al.* (1994) con las modificaciones que se describen a continuación. Las muestras se analizaron por triplicado.

Se pesaron 0,2 g de alimento con una balanza de precisión y se introdujeron en un tubo falcón de 15 ml protegido de la luz. Posteriormente, se añadieron 0,03 g de ascorbato de sodio y 5 ml de acetona. Seguidamente los tubos se taparon y se homogenizaron con un ultraturax (ART-MICCRAD-8) durante 30 segundos. Para una extracción mejor de los carotenoides y tocoferoles, los tubos se pasaron a un homogeneizador vertical donde permanecieron durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se extrajo el sobrenadante del tubo con una pipeta Pasteur de 1 ml y se trasvasó a un vial ámbar tras su filtrado a través de una membrana de 0,45 micras.

4.6.1.2. Leche

Se llevó a cabo una extracción para la cuantificación de la concentración de carotenoides y α -tocoferol y otra extracción para la cuantificación de la concentración de retinol. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Para las extracciones, siempre la tarde anterior se sacaban las muestras de leche del congelador y se mantenían en la nevera para que se produjera una descongelación lenta.

Extracción de carotenoides y tocoferoles

Se realizó en fase líquida de acuerdo con la metodología Lyan *et al.* (2001) con modificaciones, como se describe a continuación.

El día del análisis, las muestras se introdujeron en un baño de agua (40 °C) durante 30 minutos. Posteriormente se homogenizaron con el homogeneizador vertical durante 5 minutos. En un tubo eppendorf se añadieron 200 μ l de leche y 200 μ l de etanol con 5% BHT y se homogenizaron durante 5 minutos en el rotatubos. Para extraer la grasa de la leche, se le añadió 1 ml de hexano y se homogenizó durante 20 minutos en el rotatubos automático. Seguidamente los tubos se centrifugaron en la microcentrífuga con pulso (SORVALL[®] MC12V, modelo DU PONT), durante 30 segundos a 3000 r.p.m. La parte superior (hexano) se extrajo con una pipeta Pasteur de 1 ml y se depositó en un tubo eppendorf de 2 ml. Para estar seguros que toda la grasa ha pasado a la parte hexánica se realizó una segunda extracción añadiendo 1 ml de hexano. Se homogenizó durante otros 20 minutos y se centrifugó otros 30 segundos en la microcentrífuga. Se extrajo con la pipeta Pasteur de 1 ml la parte superior y se depositó en el eppendorf junto con la anterior extracción. Posteriormente se procedió a la eliminación del hexano con la centrifuga de evaporación a sequedad mediante vacío (CHRIST[®], modelo RUC 2/25 SPEED VAC), a 35 °C durante 15 minutos.

El residuo se reconstituyó con 1 ml de metanol y se homogenizó en el rotatubos durante 10 minutos. El líquido se transvasó mediante una pipeta Pasteur a un vial opaco de ámbar para su posterior determinación por HPLC.

Extracción del retinol

La extracción de retinol se realizó con la metodología de Gentili *et al.* (2012) según se describe a continuación. El día del análisis se atemperó la leche y homogenizó durante 30 minutos en un baño de agua con agitación y seguidamente se procedió a su análisis.

En un tubo de vidrio se añadieron 1 ml de leche y 3 ml de etanol (BHT 0,1%) y se homogenizaron durante 5 minutos en el rotatubos automático. Después la homogeneización, se añadieron 0,5 ml de KOH (50% w/v). Para evitar la oxidación de las vitaminas se llenó el tubo con corriente de nitrógeno y se dejó a 25 °C en un baño de agitación aproximadamente 15 horas. Tras transcurrir este tiempo, para parar la reacción se le añadieron 1,4 ml agua mili Q y 2 ml de hexano y se homogenizó durante 5 minutos. Después de centrifugar a 4 °C durante 10 minutos a 4500 r.p.m., se extrajo el sobrenadante, la parte hexánica, con una pipeta pasteur y se recogió en un tubo falcon de 15 ml. Dicha extracción se repitió 3 veces más (total 4 extracciones).

Una vez realizadas las cuatro extracciones, se añadieron 2 ml de agua al tubo falcon, para eliminar los álcalis, y seguidamente se homogenizó durante 5 minutos en el rotatubos automático. Tras la homogenización, se depositó la parte hexánica en un tubo de vidrio de 10 ml de fondo cónico y se evaporó casi a sequedad (100µl) mediante vacío y se centrifugó a 35 °C durante 25 minutos. Posteriormente, se reconstituyó el residuo con 1 ml metanol (BHT 0,1%) y homogenizó durante 10 minutos. Se traspasó el contenido mediante pipeta Pasteur a un vial ámbar para su determinación por HPLC.

4.6.1.3. Plasma

La extracción de carotenoides y tocoferoles en el plasma se hizo en fase líquida siguiendo la metodología Lyan *et al.* (2001) con algunas modificaciones. La mañana del análisis se extrajeron los tubos con el plasma del congelador para que se descongelaran. Una vez descongelados se homogeneizaron en el rotatubos automático. En un tubo eppendorf se añadieron 200 µl de plasma y 200 µl de etanol con 5% BHT (2,6 Di-ter-Butil-4-Metilfenol, 98%PS) y se homogenizaron durante 5 minutos. Seguidamente se le añadió 1 ml de hexano y se homogenizó durante 20 minutos en el rotatubos automático. Los tubos se centrifugaron durante 30 segundos a 3000 r.p.m. en la microcentrífuga.

La parte superior líquida (hexano) se extrajo con una pipeta pasteur y se depositó en un tubo eppendorf de 2 ml. Se realizó una segunda extracción añadiendo 1 ml de hexano y centrifugando otros 30 segundos en la microcentrífuga. La parte superior extraída se depositó junto con la primera extracción en el tubo eppendorf y se llevaron a evaporar a sequedad mediante vacío y centrifugación a 35 °C durante 20 minutos. La muestra se reconstituyó con 1 ml de metanol, se homogenizó durante 10 minutos y se transvasó a

un vial opaco. Por último, se congeló (-18°C) hasta su posterior determinación cromatográfica

4.6.1.4. Músculos *Longissimus thoracis* y *Semitendinosus*

Se llevó a cabo una extracción para la determinación de la concentración de carotenoides y α -tocoferol y otra para la determinación de la concentración de retinol en ambos músculos. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

- Extracción para la determinación de carotenoides y tocoferoles

La extracción líquida de carotenoides y tocoferol de ambos músculos se realizó según el método propuesto por Lyan *et al.* (2001) con algunas modificaciones. La carne liofilizada se picó en una picadora el mismo día del análisis. En los tubos eppendorf de 2 ml se añadieron 100 mg de carne liofilizada picada y 400 μ l de etanol con 5% BHT. Los tubos se homogenizaron durante 2 minutos en el rotatubos y se les añadió 1 ml de hexano y se volvieron a homogenizar durante 20 minutos. Tras la homogeneización, los tubos se centrifugaron con la microcentrifuga durante 30 segundos a 3000 r.p.m.. La parte superior líquida hexánica se extrajo con una pipeta pasteur y se depositó en un tubo eppendorf de 2 ml. Dicho proceso se repitió una segunda vez. La parte superior líquida hexánica de la segunda extracción se añadió al tubo eppendorf donde estaba almacenada la primera extracción. Dicho tubo se evaporó a sequedad mediante vacío y se centrifugó a 35 °C durante 20 minutos. Se reconstituyó el residuo seco con 1 ml de metanol y se homogenizó durante 10 minutos en el rotatubos. El líquido resultante se traspasó con una pipeta Pasteur a un vial opaco ámbar para su posterior determinación por HPLC.

- Extracción para la determinación de retinol

El método de extracción empleado se realizó en dos fases, según la técnica de Osorio *et al.* (2008) que a su vez modifica la técnica de (Yang *et al.*, 1992):

Fase 1. Extracción en frío de la grasa de carne liofilizada. En un tubo falcon de 50 ml se añadieron 2,5 g de muestra liofilizada, 5 ml de cloroformo y 10 ml de metanol. La mezcla se homogeneizó durante 2 minutos en el rotatubos automático. Se añadieron 5 ml de cloroformo y 10 ml de cloruro de potasio (KCl) al 0,88 % en agua. La mezcla se homogenizó durante 15 minutos en el rotatubos automático y se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. La parte superior de la mezcla (cloroformo) se extrajo con la pipeta Pasteur y se depositó en un tubo de vidrio de tapa de rosca de 12 ml, se le

añadieron 10 μ l metanol con antioxidante BHT (5%) y se evaporó a sequedad durante 1 hora a 45 °C en una centrífuga de vacío.

Fase 2. Extracción de retinol. Al extracto graso de la fase anterior se le añadió 1 ml de metanol con 20% de hidróxido de potasio (KOH). La mezcla se mantuvo en un baño de agua a 68 °C durante 45 minutos. Posteriormente, se añadieron a la mezcla 3 ml de éter dietílico y se homogeneizó durante 15 minutos. La parte superior de la mezcla se extrajo con una pipeta Pasteur y se depositó en un tubo de vidrio de 12 ml. Este proceso se repitió y la segunda fase lipofílica se añadió a la obtenida en la primera extracción. El éter dietílico se eliminó evaporando a sequedad durante 2 horas a 45 °C en una centrífuga de vacío. El residuo se reconstituyó con 1 ml de metanol con 5% de BHT y se homogenizó durante 10 minutos. El residuo se trasvaso a un vial opaco y se congeló hasta su posterior determinación por HPLC.

4.7. Condiciones cromatográficas

El retinol, la luteína, el β -caroteno, α -tocoferol y γ -tocoferol se determinan por UHPLC (Acquity H-Class, Water; Milford, Massachusetts. USA). La separación de los compuestos se realizó con una columna Kinetex RP C₁₈, de 100×4,6 mm y 2,1 micras, dicha columna está en línea con un filtro precolumna krudKatcher ultra HPLC. El equipo de cromatografía líquida estaba equipado con dos detectores, un detector de red de fotodiodos que tiene un barrido de 210 a 600 nm y otro de fluorescencia. La luteína y el β -caroteno se detectaron con el detector de red de fotodiodos a 450 nm, retinol con el detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 317 nm y de emisión (λ_{em}) de 468 nm, y finalmente, los tocoferoles con el detector de fluorescencia a λ_{ex} 293 nm y λ_{em} 322. La fase móvil era metanol (con 0,05% de trietanolamina) con un flujo de 1,5 ml/min en isocrático. El análisis se llevó a cabo a una temperatura controlada, usando un horno de columna a 35°C y una cámara de muestras preinyección a 15°C en el automuestrador. El tiempo de análisis fue de 6 minutos.

Los compuestos se identificaron mediante la comparación con los tiempos de retención y espectro de sus respectivos estándares (>95%). La disolución de los respectivos estándares (Sigma Aldrich) se realizó en metanol evitando el contacto con la luz y se guardaron a -80°C. La concentración exacta se determinó por espectrofotometría. Se realizaron hasta siete disoluciones por cada estándar (500 a 0,1 μ g ml⁻¹) para elaborar una curva de calibración con siete puntos. También, se efectuó una evaluación

preliminar de la metodología analítica empleada que incluyó estudios de especificidad, sensibilidad recuperación y precisión.

4.8. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se han realizado con la versión 9.3 del programa estadístico SAS. En primer lugar se comprobó la distribución normal de los residuos de las variables con el test Shapiro-Wilk. Todos los parámetros tuvieron distribución normal de los residuos.

El contenido en carotenoides y tocoferoles de cada alimento se determinó para cada tratamiento utilizando el procedimiento Proc means. La concentración de retinol y α -tocopherol de la leche de las ovejas y del plasma de las oveja y de los corderos se analizó mediante modelos mixtos con el Proc mixed. Para la concentración en la leche se realizó un análisis de medidas repetidas con el tipo de forraje, la inclusión de taninos condensados en el pienso, la semana de lactación y sus interacciones como efectos fijos y la oveja como efecto aleatorio. Para la concentración en el plasma de las ovejas y los corderos se realizó un análisis de medidas repetidas con el tipo de forraje, la inclusión de taninos condensados en el pienso, fase de lactación y sus interacciones como efectos fijos y la oveja o cordero como efecto aleatorio. Se ajustó el grado de libertad con la corrección de Kendward-Rodgers para tener en cuenta que el número total de observaciones pudo ser desigual en los lotes. Se utilizaron diferentes matrices de varianza-covarianza y se eligieron las que presentaron los menores valores del criterio de información de Akaike y criterio de información Bayesiano.

La concentración de α -tocopherol, retinol y luteína del músculo de los corderos se analizó con un modelo mixto con el Proc mixed. Los efectos fijos considerados fueron: el tipo de forraje, la inclusión de taninos condensados en el pienso, el músculo y sus interacciones y el efecto aleatorio el cordero. Para todos los análisis se obtuvieron las Lsmeans y se compararon mediante el t-test.

Se hicieron análisis discriminantes con el Proc discrim para estudiar el porcentaje de animales clasificados correctamente según su alimentación en función de la concentración de carotenoides, retinol y α -tocopherol en el plasma, la leche y ambos músculos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los contenidos de carotenoides, retinol y tocoferoles en el plasma, leche y carne se presentan según el efecto del forraje recibido por la oveja y según la inclusión de taninos condensados en el pienso por separado porque no ha habido interacción entre estos dos efectos en ninguna de las variables estudiadas.

5.1. Contenido en carotenoides y tocoferoles de los alimentos

Los contenidos de luteína, β -caroteno, γ -tocoferol y α -tocoferol de cada uno de los alimentos utilizados en el ensayo se muestran en la Tabla 2. La pradera presentó unos contenidos en carotenoides y α -tocoferol notablemente superiores al heno de pradera y al pienso. Los presentes resultados están de acuerdo con diversos trabajos presentes en la bibliografía (ver Tabla 3).

El menor contenido en luteína y β -caroteno en el heno y en el pienso se debe en gran parte a los procesos de conservación (exposición al sol, temperaturas y humedad), henificación y a los procesos de fabricación del pienso que implica varios procesos de molienda, higienización del pienso y granulación, lo que implica calor y humedad.

Tabla 2. Contenido en carotenoides y tocoferoles del heno, pradera y pienso control y pienso con taninos condensados (TC)

	Heno	Pradera	Pienso con TC ¹	Pienso control
Luteína, $\mu\text{g/g MS}$	100 (4,7)	582 (29,5)	1 (0,3)	1 (0,6)
β -caroteno, $\mu\text{g/g MS}$	23,7 (2,7)	740 (29,5)	0 (0,0)	0,1 (0,1)
α -tocoferol, $\mu\text{g/g MS}$	10,9 (0,9)	148 (11,9)	5 (0,8)	14 (1,5)
γ -tocoferol, $\mu\text{g/g MS}$	1,7 (0,2)	6,2 (0,7)	6 (0,6)	7 (0,7)

¹Pienso con 10% de quebracho con 75% de taninos condensados; Entre paréntesis, error estándar

En la pradera el carotenoide más abundante fue el β -caroteno seguido por la luteína mientras que en el heno, el más importante fue la luteína. La concentración de luteína en el heno comparado con el forraje fresco fue del 15% y la del β -caroteno del 2,9%. Similares diferencias encontró Barron *et al.* (2012) en forrajes tropicales en los cuales la concentración de luteína fue inferior, alrededor del 20% y el β -caroteno alrededor del 2% del heno frente al fresco.

En el pienso, hubo una baja presencia de carotenoides y tocoferoles, siendo éstos últimos más abundantes que los primeros. La presencia de γ -tocoferol en el pienso podría estar relacionada con la presencia de soja y maíz presentes en la composición del pienso (Slover, 1971, Kurilich y Juvik, 1999, Rani *et al.*, 2007).

Tabla 3. Contenido de carotenoides y tocoferoles en heno, pradera y pienso encontrados en la bibliografía

	Alimento		
	heno	pradera	pienso
Luteína, µg/g MS	106 ⁶ ; 18 ⁷	48,5 ² ; 437 ⁴	2,1 ¹
β-caroteno, µg/g MS	36 ⁵ ,15 ⁶ ; 0 ⁷ ;	74,1 ² ;123 ⁴ ;196 ⁵	0 ^{6,7}
γ-tocoferol, µg/g MS	9,4 ³	*	*
α-tocoferol, µg/g MS	22,3 ³ ; 61 ⁵	15,6 ² ; 161 ⁵	*

¹Dian *et al.*, 2007; ²Alvarez *et al.*, 2014; ³Pavel, 2013; ⁴Prache *et al.*, 2009; ⁵Ballet, 2001; ⁶Calderon *et al.*, 2007; ⁷Calderon *et al.*, 2006, *No se han encontrado datos

El retinol no fue detectado en ninguno de los alimentos estudiados porque tal y como se ha explicado en la revisión bibliográfica la vitamina no se encuentra en las plantas sino que se forma en los animales a partir del β-caroteno y otras provitaminas con la ayuda de una enzima específica situada en las paredes intestinales de los animales (Blomhoff y Kiil, 2006).

5.2. Concentración de vitaminas liposolubles según el forraje recibido por la oveja

5.2.1. En el plasma de la oveja

En el plasma de las ovejas se detectó retinol pero no se detectó ni luteína ni β-caroteno. (Yang *et al.*, 1992) encontraron tanto retinol como luteína pero la cantidad detectada de luteína fue solo el 1,7 % de la cantidad de retinol encontrada. Además se detectó α-tocoferol, que es la principal forma en la cual se transporta el tocoferol y no fue posible detectar γ-tocoferol, cuya concentración es inferior a la de α-tocoferol en 1,5 veces (AlSenaidy, 1996).

La concentración de retinol en el plasma de las ovejas durante la lactación se vio afectado por la interacción entre el forraje recibido por la oveja y la fase de la lactación ($P = 0,02$) (Figura 7). En el tratamiento Estabulado dicha concentración no se modificó durante la lactación. Sin embargo, la concentración de retinol de las ovejas del lote Pastoreo permaneció estable en la primera mitad de la lactación ($P = 0,53$) y se incrementó en segunda mitad de la lactación ($P < 0,001$). Esto supuso que la concentración de retinol fuera similar entre los dos tratamientos al inicio de la lactación ($P = 0,20$) y en la mitad de la lactación ($P = 0,44$) pero un 37% superior en las ovejas de

lote de Pastoreo que las del lote Estabulación en la fase final de la lactación ($P = 0,0007$).

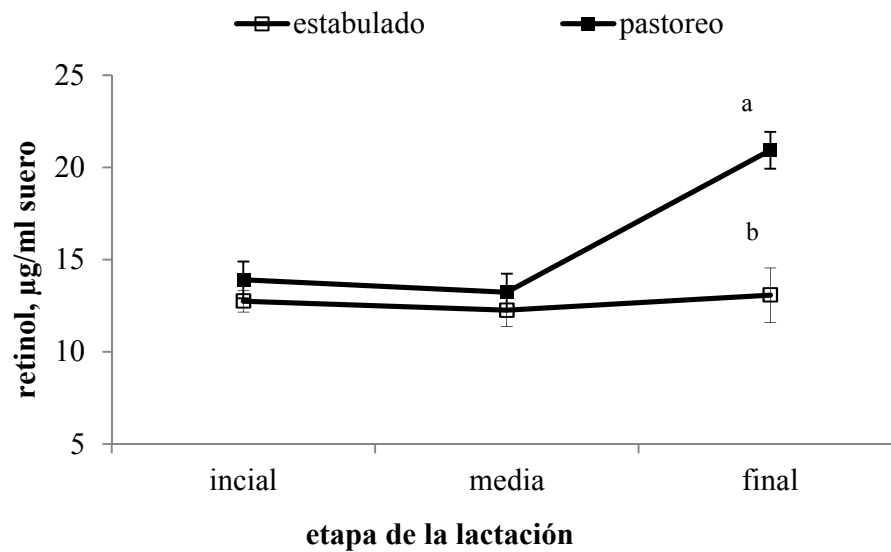


Figura 7. Concentración de retinol en el plasma de la oveja según el forraje recibido por la oveja durante la lactación.

En una fase de la lactación, letras diferentes (a,b) indican diferencias al $P < 0,05$

Una respuesta positiva de la concentración de retinol en el plasma debido a un incremento en los carotenoides ingeridos con la dieta fue encontrado tanto en ovejas (Weir *et al.*, 1949) como en vacas (Chawla y Kaur, 2004). En general, parece que una baja ingestión de vitamina A en la dieta no se traduce en bajadas en la concentración de retinol en la sangre porque las ovejas movilizan retinol del hígado (Debier y Larondelle, 2005). Al suplementar las ovejas con altas dosis de vitamina A (12000 UI), hace incrementar (x 6) la concentración de retinol en el plasma (Donoghue *et al.*, 1984). En vacas en lactación, cuando se compararon dietas con diferentes concentraciones de carotenoides (ensilado rico en carotenoides vs. heno pobre en carotenoides), la concentración de retinol en el plasma fue mayor en las vacas alimentadas con ensilado que con heno (Calderón *et al.*, 2007). La baja concentración de retinol en el plasma de las ovejas en las primeras fases de la lactación pueden deberse a que gran cantidad de retinol pasa al calostro y leche en las primeras fases de la lactación (Debier *et al.*, 2005) por lo que bajan la concentración del retinol en el plasma a pesar de ingerir dietas ricas en carotenoides.

La concentración de α -tocoferol en el plasma de las ovejas también presentó una interacción entre el forraje ingerido por la oveja y la fase de la lactación ($P = 0,003$)

(Figura 8). En las ovejas del tratamiento Estabulado, la concentración de α -tocoferol no se modificó al inicio y mitad de la lactación ($P = 0,23$) pero se incrementó en un 33,5% a en la segunda mitad de la lactación ($P = 0,05$). En las ovejas en Pastoreo, la concentración de α -tocoferol se incrementó en un 39% entre la primera mitad ($P = 0,01$) y un 47% en la segunda mitad de lactación ($P = 0,001$). La elevada concentración de α -tocoferol en el calostro puede ser la causa de que las las concentraciones de α -tocoferol en la sangre de los rumiantes entorno al parto sea baja y se incremente llegando a los valores basales a las pocas semanas de la lactación (Debier *et al.*, 2005).

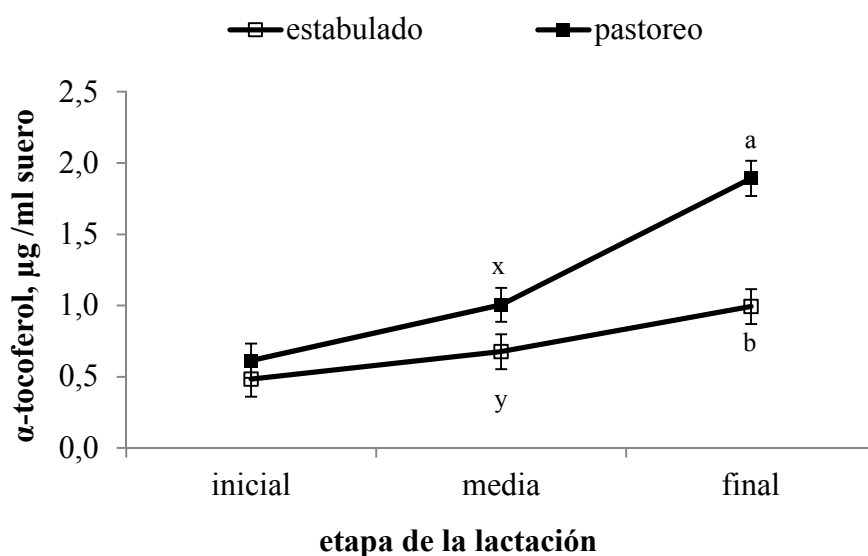


Figura 8. Concentración de α -tocoferol en el plasma de la oveja según el forraje recibido durante la lactación.

En una fase de la lactación, letras diferentes (a,b) indican diferencias al $P < 0,05$ y (x,y) indican diferencias al $P < 0,10$.

La concentración de α -tocoferol fue similar entre tratamientos al inicio de la lactación pero fue superior en las ovejas del lote Pastoreo que en del Estabulado entre la fase media ($P = 0,06$) y fase final (47%; $P = 0,001$) de la lactación, momento en el cual fue más notable la diferencia entre los dos lotes. Un incremento en la ingestión de vitamina E a través de suplementación de las ovejas durante la gestación y lactación supuso un incremento de α -tocoferol en el plasma de las ovejas durante la lactación (Njeru *et al.*, 1994, McDowell *et al.*, 1996). Los presentes resultados muestran que las concentraciones de α -tocoferol en el plasma de la oveja parece estar ligada a la composición de dicho compuesto en la dieta, lo que esta de acuerdo con lo observado por Calderón *et al.* (2007) en vacas en lactación.

5.2.2. En la leche de la oveja

En la leche se detectó retinol y α -tocoferol pero no β -caroteno, luteína y γ -tocoferol. Con este mismo método, pero distinta columna, Gentili *et al.* (2012) fueron capaces de detectar en leche de oveja además de estos compuestos, luteína (en cantidad muy baja) y γ -tocoferol. El motivo por el cual no fuimos capaces de detectarlo es desconocido ya que el equipo de Gentili no expone la alimentación recibida por las ovejas, lo que puede ser determinante en la detección de estos compuestos en leche.

En la Figura 9 se muestra la evolución de la concentración de retinol en la leche de las ovejas según el forraje que han recibido a lo largo de la lactación. Las ovejas del lote Pastoreo muestran concentración de retinol en la leche más alta que las ovejas del lote Estabulado, que recibieron una dieta de heno a lo largo de toda la lactación ($P < 0,001$).

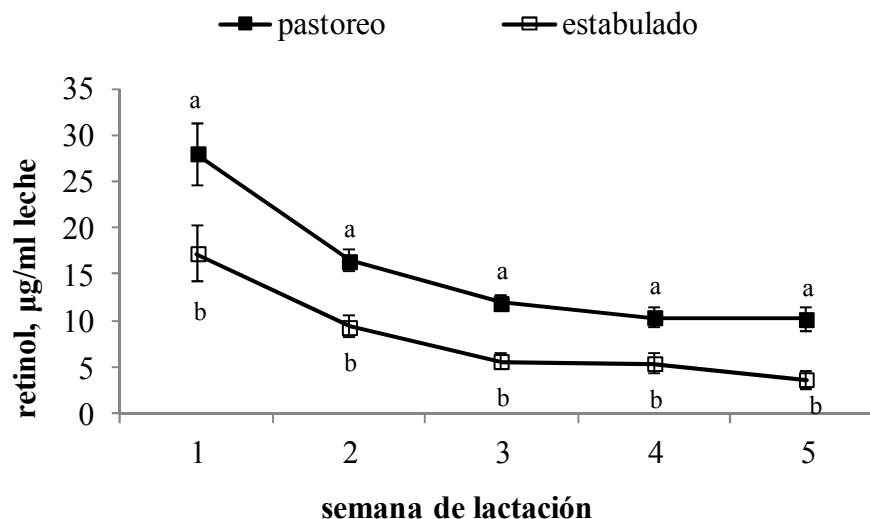


Figura 9. Concentración de retinol en la leche según el forraje recibido por la oveja durante la lactación.

En una semana de lactación, diferente letra (a,b) indica diferencias al $P < 0,05$

El retinol presente en los productos animales proviene de la conversión de los carotenoides presentes en los forrajes, principalmente del β -caroteno, como ya se ha comentado anteriormente. En un estudio que evaluaba el efecto de la utilización de raciones invernales con bajo contenido en caroteno (paja frente vs. heno de alfalfa) se encontró que la leche de las ovejas presentó similar concentración de retinol en las primeras semanas de lactación, pero posteriormente la leche de las ovejas con heno de alfalfa presentó más retinol que las que recibieron paja (Weir *et al.*, 1949).

Las mayores concentraciones de retinol en la leche observadas en la primera semana de lactación están de acuerdo con los resultados observados en varios estudios (Batra y Hidirolou, 1995, Asadian *et al.*, 1996, Koutsoumpas *et al.*, 2013), los cuales concluyeron que los contenidos en retinol son muy elevados en el calostro y al inicio de la lactación. Un efecto parecido se ha visto en cabras, que tienen el metabolismo de carotenoides similar a la oveja, donde la concentración de retinol en la leche disminuyó al disminuir la ingestión de forraje fresco (Martin *et al.* (2004). Sin embargo cuando las diferencias de ingestión de carotenoides entre dietas ricas y pobres en dichos compuestos en vacas de leche son elevadas, la concentración de retinol y β -caroteno es superior en los animales que reciben alimento rico en carotenoides (Calderón *et al.*, 2007).

La semana de la lactación tuvo efecto sobre la concentración de retinol en la leche ($P < 0,001$), siendo superior la concentración en la semana 1 al resto de semanas ($P < 0,005$). Estos resultados concuerdan con los resultados de varios estudios en ovejas (Weir *et al.*, 1949) y en vacas (Calderón *et al.*, 2006), que demuestran que el calostro presenta una gran concentración de retinol, la cual va descendiendo, rápidamente durante la primera semana de la lactación y más lentamente en las semanas posteriores. Las mayores concentraciones de retinol en la leche observadas en la primera semana de lactación están de acuerdo con los resultados observados en distintos estudios en los que se suplementaba a las ovejas con vitamina A (Batra y Hidirolou, 1995, Asadian *et al.*, 1996, Koutsoumpas *et al.*, 2013), los cuales concluyeron que la suplementación con vitamina A en la dieta materna durante la gestación, aumenta significativamente su concentración en el calostro y la leche de la madre alrededor del parto y durante los primeros días de la lactación. Esto se debe principalmente a que la vitamina A se transporta como retinol unido a sus proteínas de transporte RBP, y alrededor del parto aumenta notablemente en la glándula mamaria los receptores implicados en la captación de RBP-retinol, lo que permite mayor absorción de la vitamina A y mayor transferencia en el calostro (Debier *et al.*, 2005).

En la Figura 10 se muestra la evolución de la concentración de α -tocoferol en la leche de las ovejas según el forraje recibido. Dicha concentración en la leche dependió del tipo de forraje (pradera vs. heno) ingerido por la oveja ($P < 0,001$) y de la semana de la lactación ($P < 0,001$). A lo largo de toda la lactación, la concentración de α -tocoferol en la leche fue mayor, un 50% de media, en las ovejas del lote Pastoreo que en las de lote

Estabulado ($P < 0,001$), debido principalmente al mayor contenido de α -tocoferol en el pasto que en el heno (Tabla 2). No se han encontrado resultados comparables en ovino según la alimentación forrajera ya que la mayoría de los estudios se han centrado en el estudio del efecto de α -tocoferol administrado en forma oral o inyectada. Hay una relación directa y positiva entre la ingestión de α -tocoferol y su concentración en leche tanto en vacas (Calderón *et al.*, 2006, Butler *et al.*, 2008) como en cabras (Delgado-Pertíñez *et al.*, 2013). La suplementación con acetato de tocoferol en la dieta de ovejas provocó un incremento de la concentración de α -tocoferol en la leche (Njeru *et al.*, 1994, Guidera *et al.*, 1997, Capper *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2005) de igual forma que cuando el α -tocoferol era administrado vía intravenosa (Meneses *et al.*, 1994).

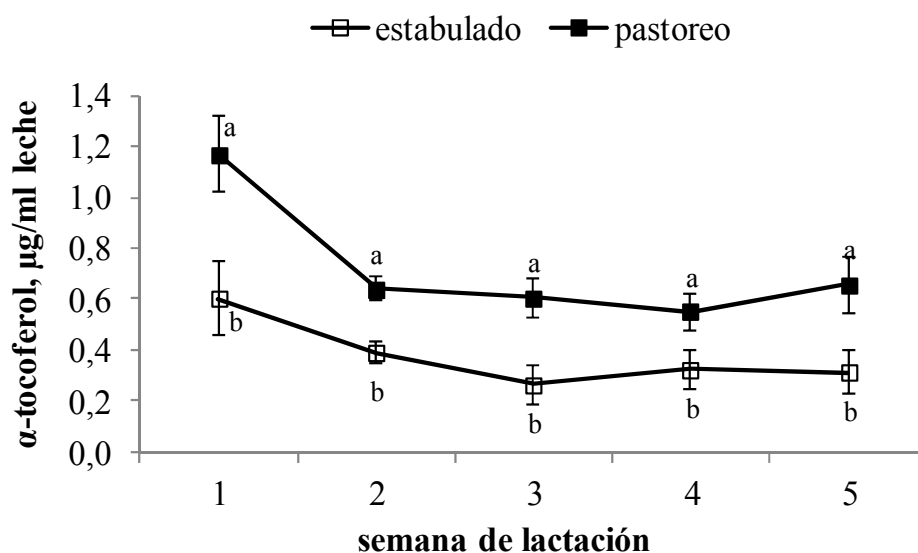


Figura 10. Concentración de α -tocoferol en la leche según el forraje ingerido por las ovejas.

En una semana, letras diferentes (a,b) indican diferencias al $P < 0,05$

En la leche hubo una disminución de la concentración de α -tocoferol entre la semana 1 y 2 de lactación ($P < 0,001$) permaneciendo sin cambios hasta la quinta semana de la lactación. La disminución entre la primera y segunda semana se debe a que la concentración de α -tocoferol es mayor en el calostro que en la leche de oveja (Loudenslager *et al.*, 1986, Njeru *et al.*, 1994)

5.2.3. En el plasma de los corderos

En el plasma de los corderos, al igual que en el plasma de sus madres, se han detectado retinol y α -tocoferol lo que concuerda con los resultados observados por Álvarez *et al.* (2014) en corderos lechales. En corderos en pastoreo además se ha detectado luteína y

β -caroteno en el plasma (Álvarez *et al.*, 2014) y luteína, zeaxantina y β -caroteno y (Prache *et al.*, 2003) pero no determinaron retinol. La ingestión de carotenoides y tocoferol por parte de corderos destetados es mayor que en corderos lechales, que los ingieren a través de la leche materna, por lo que la cantidad de luteína y β -caroteno presente en el plasma de los lechales sea muy baja y por tanto difícil de detectar.

La concentración de retinol de los corderos también presentó una interacción entre el forraje recibido por la oveja y la fase de la lactación ($P = 0,001$) (Figura 11). Al inicio de la lactación, la concentración de retinol fue similar entre tratamientos ($P = 0,13$), aunque los corderos del lote Pastoreo presentaron siempre una mayor concentración de retinol en el plasma que los corderos del lote Estabulado, siendo las diferencias significativas en la mitad ($P = 0,007$) y final de la lactación ($P = 0,001$).

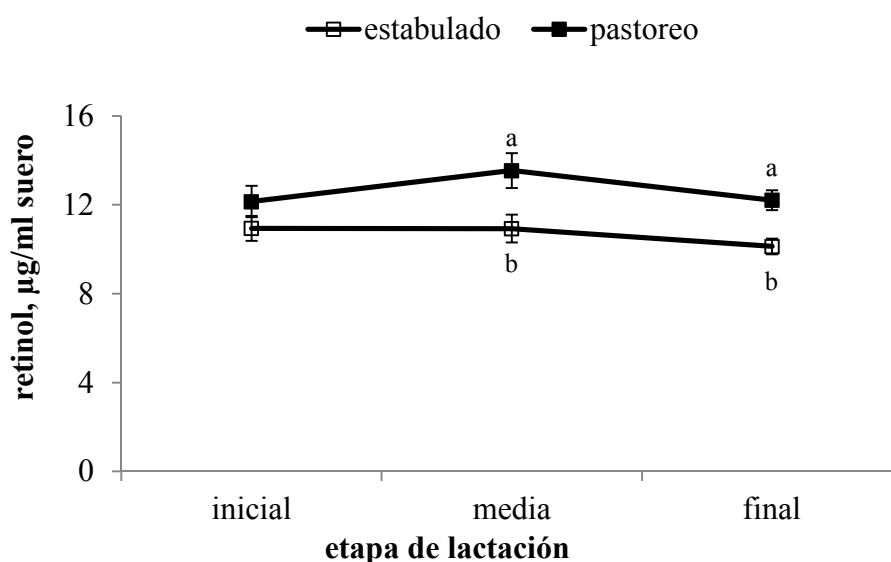


Figura 11. Concentración de retinol en el plasma de los corderos según el forraje ingerido por la madre.

En una fase de la lactación, diferentes letras (a,b) indican diferencias al $P < 0,05$

Estos resultados contradicen los resultados encontrados por Álvarez *et al.* (2014), en corderos destetados y sacrificados con 90 días, en los cuales la concentración de retinol fue superior para los corderos alimentados con pienso que los alimentados en pastoreo. Estos mismos autores detectaron, sin embargo, en los corderos en pastoreo luteína y β -caroteno en el plasma por lo que el metabolismo de los carotenoides puede ser diferente y parte del β -caroteno en estos corderos se transporta como tal, mientras que parece que en los corderos más jóvenes se transforma mayoritariamente en retinol. Álvarez *et al.* (2015), en una revisión sobre los carotenoides y vitamina A, expusieron que en ovino se asume que todo el β -caroteno se transforma en retinol, lo que no es totalmente cierto, ya

que se encuentran pequeñas cantidades en plasma. Parece que las fracciones lipoproteicas del plasma están implicadas en el transporte de los carotenoides y retinol, lo que puede influir en sus concentraciones de tocoferoles y carotenoides en el plasma (Yang *et al.*, 1992).

En los corderos del lote Pastoreo, la concentración de retinol se incrementó en la primera mitad de lactación ($P = 0,001$) y se mantuvo en el final de la lactación ($P = 0,68$). Sin embargo, en los corderos del tratamiento Estabulado, la concentración de retinol se mantuvo en sus niveles basales durante toda la lactación ($P > 0,05$). Parece ser que la dieta pobre en carotenoides no afectó a la concentración de retinol en el plasma porque los corderos movilizan sus reservas en el hígado para que la concentración en el plasma se mantenga estable (Debier y Larondelle, 2005).

La concentración de α -tocoferol en el plasma de los corderos durante la lactación dependió del forraje recibido por la oveja ($P = 0,01$) y de la fase de la lactación ($P = 0,006$) (Figura 12).

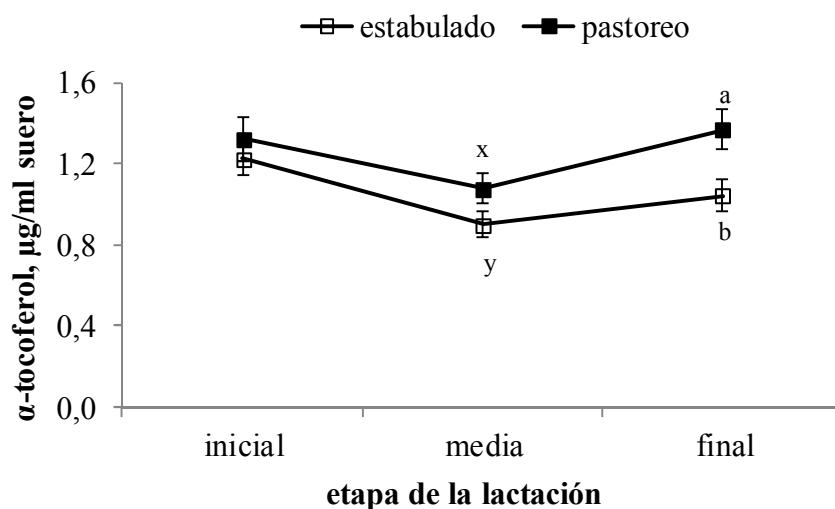


Figura 12. Concentración de α -tocoferol en el plasma de los corderos durante la lactación según el forraje ingerido por la madre.

En una fase de la lactación, letras diferentes (a,b) indican diferencias al $P < 0,05$ y (x,y) indican diferencias al $P < 0,10$.

De media, los corderos del tratamiento Pastoreo presentaron mayor concentración de α -tocoferol en el plasma que los Estabulado (1,26 vs. 1,06; $P = 0,01$). La concentración de α -tocoferol siguió el mismo comportamiento en ambos tratamientos.

Cuando se determinó la concentración a lo largo de la lactación se pudo observar que al inicio los dos tratamientos presentaron una concentración similar, sin diferencias

significativas, sin embargo los corderos del lote Pastoreo presentaron un contenido en α -tocoferol 20% y 31% mayor en la mitad ($P = 0,08$) y final ($P = 0,02$) de la lactación que los corderos Estabulados, respectivamente. Los resultados obtenidos son similares a los resultados obtenidos por Álvarez *et al.* (2014), en los cuales los corderos alimentados con pasto presentaron más concentración de α -tocoferol que los corderos alimentados con pienso ($P < 0,001$). De manera similar, los corderos en pastoreo de alfalfa con sus madres presentaron mayor concentración de α -tocoferol que los destetados que recibieron pienso sin suplementación de acetato de tocoferol. El α -tocoferol en el plasma de los corderos tuvo una concentración promedio de 1,27 $\mu\text{g/ml}$ al inicio de la lactación debido principalmente a la toma de calostro, posteriormente descendió a 0,99 $\mu\text{g/ml}$ por la bajada de α -tocoferol en la leche. Posteriormente, en los corderos del lote Pastoreo se volvió a incrementar el α -tocoferol del plasma ($P = 0,02$) mientras que se mantuvo constante en los corderos Estabulado ($P = 0,15$). En los corderos lactantes la ingestión de α -tocoferol proviene de la leche de las madres, la cual va descendiendo a lo largo de la lactación (González-Calvo *et al.*, 2014), y de la ingestión de forraje fresco. (González-Calvo *et al.*, 2014), en un estudio en el que comparaban los corderos lactantes en pastoreo de alfalfa con corderos destetados que recibían concentrado comercial, observaron que la concentración de α -tocoferol en el plasma de las ovejas en pastoreo permanenció estable en las últimas fases de la lactación, por lo que no parece que la ingestión de tocoferol de la leche sea la causante del incremento de la concentración de tocoferol en el plasma de los corderos de pastoreo. Podría ser que los corderos hubieran comenzado a ingerir algo de pasto (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2007), ingiriendo un alimento rico en α -tocoferol y por tanto incrementando la concentración de α -tocoferol en el plasma. Según Lee *et al.* (2007), la concentración de α -tocoferol en el plasma de corderos se saturó a las 2 semanas de la inclusión de vitamina E en la dieta, momento en el cual se inicia su deposición en los tejidos, mientras que según Gonzalez-Calvo *et al.* (2015), la saturación se alcanzó a partir del 7 día de ingestión

5.2.4. En el músculo de los corderos

En los músculos *Longissimus thoracis* y *Semitendinosus*, se detectó retinol y α -tocoferol y luteína únicamente en el músculo *Semitendinosus*. No se detectó β -caroteno en ninguno de los músculos estudiados. De manera similar, Osorio *et al.* (2008) determinaron retinol, α - y γ -tocoferol en corderos lechales. La mayoría de los estudios se centran en el estudio del α -tocoferol en el músculo (Kasapidou *et al.*, 2009,

D'Alessandro *et al.*, 2012, González-Calvo *et al.*, 2014) , habiendo escasos estudios del γ -tocoferol (Quaresma *et al.*, 2012).

La concentración de retinol en el músculo estuvo afectada por la interacción entre el forraje ingerido por la madre y el músculo estudiado (Figura 13) ($P < 0,03$). La concentración de retinol en el músculo *Longissimus thoracis* fue similar entre tratamientos ($P = 0,72$), mientras que dicha concentración en el músculo *Semitendinosus* fue un 30% superior en el tratamiento Pastoreo respecto al Estabulado ($P = 0,05$).

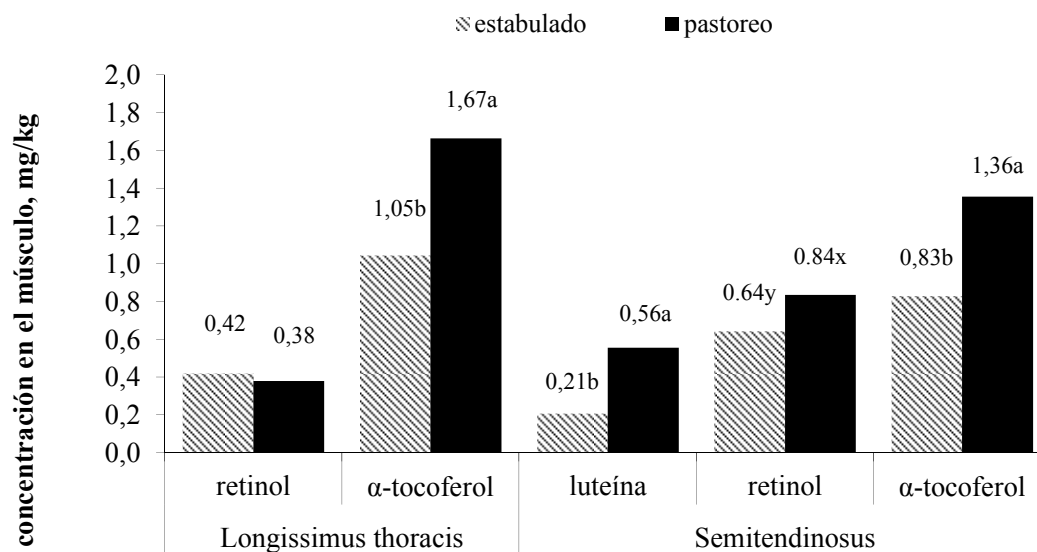


Figura 13. Concentración de luteína, retinol y α -tocoferol en el músculo *Longissimus thoracis* y *Semitendinosus* de los corderos según el forraje ingerido por la madre. Dentro de un parámetro y músculo, medias con diferente letra (a,b) indican diferencias entre la alimentación recibida por la madre al $P < 0,05$ y medias con diferente letra (x,y) indican diferencias al $P < 0,10$.

Osorio *et al.* (2008), encontraron que los corderos alimentados con leche reemplazante enriquecida en retinol y tocoferoles presentaron una concentración un 41% y 24% superior a los corderos alimentados con leche materna en el músculo *Longissimus dorsi* y en el músculo de la pierna (no especifica el tipo de músculo). Lo que coincide en parte con los resultados de nuestro estudio donde se encontró más retinol en el músculo *Semitendinosus* que en el músculo *Longissimus thoracis* (0,74 vs 0,40 mg/kg MF, respectivamente; $P = 0,001$).

La concentración de α -tocoferol dependió del alimento ofrecido a la madre ($P < 0,001$) y del tipo de músculo ($P < 0,001$). Los corderos de lote Pastoreo presentaron mayor concentración de α -tocoferol que los corderos del lote Estabulado tanto en el músculo

Longissimus thoracis (37%) como en el *Semitendinosus* (39%) ($P < 0,001$). Resultados similares encontraron y observaron que el contenido en α -tocoferol en el músculo *Semimembranosus* fue un 56% superior en el de los corderos cuyas madres pastaban frente a aquellos cuyas madres estaban estabuladas. Así mismo, corderos lactantes en pastoreo de alfalfa presentaron una concentración de α -tocoferol superior que los estabulados alimentados con concentrado (González-Calvo *et al.*, 2014). Las diferencias entre estudios se deben a que otros factores influyen en la deposición del α -tocoferol como son la alimentación (Descalzo *et al.*, 2005), el tipo de músculo (González-Calvo *et al.*, 2014) y la edad de los corderos al sacrificio (Turner *et al.*, 2002, Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008). En cuanto al músculo, se encontró en el presente estudio mayor concentración de α -tocoferol en el músculo *Longissimus thoracis* que en el *Semitendinosus* (ver discusión en el punto 5.3.4.)

La concentración de luteína, detectada únicamente en el músculo *Semitendinosus*, dependió de la alimentación (D'Alessandro *et al.*, 2012) ingerida por la madre (Figura 9). Los corderos del lote Pastoreo presentaron mayor concentración de luteína en el músculo que los del lote Estabulado ($P < 0,001$), reflejando las diferencias en la ingestión de luteína de la pradera y del heno (582 $\mu\text{g/g MS}$ vs. 100 $\mu\text{g/g MS}$). No ha sido posible encontrar referencias en la bibliografía sobre el contenido de luteína en el músculo de rumiantes. Según Yang *et al.* (1992), el único carotenoide que se deposita en ovino es la luteína y en cantidades mínimas, especialmente si se compara con el vacuno (Álvarez *et al.*, 2015). La detección de luteína en el músculo *Semitendinosus* y no en el *Longissimus dorsi* puede estar relacionado con un menor contenido en grasa intramuscular en el *L. dorsi*, aunque ello no se puede comprobar por la falta de muestra del músculo *Semitendinosus* para la determinación de la grasa intramuscular.

5.3 Concentración de vitaminas liposolubles según la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja

Los estudios sobre la inclusión de taninos condensados en la dieta de rumiantes se han centrado en el metabolismo ruminal y los efectos sobre el perfil de ácidos grasos en la leche y carne derivados de los cambios producidos en el rumen. En humana se ha estudiado el efecto de los taninos condensados por su alta actividad antioxidante (Santos-Buelga y Scalbert, 2000, Acamovic y Brooker, 2005).

5.3.1. En el plasma de la oveja

La concentración de retinol en el plasma de las ovejas no se vio afectado por la inclusión de taninos condensados en el pienso ($P = 0,82$) (Figura 14).

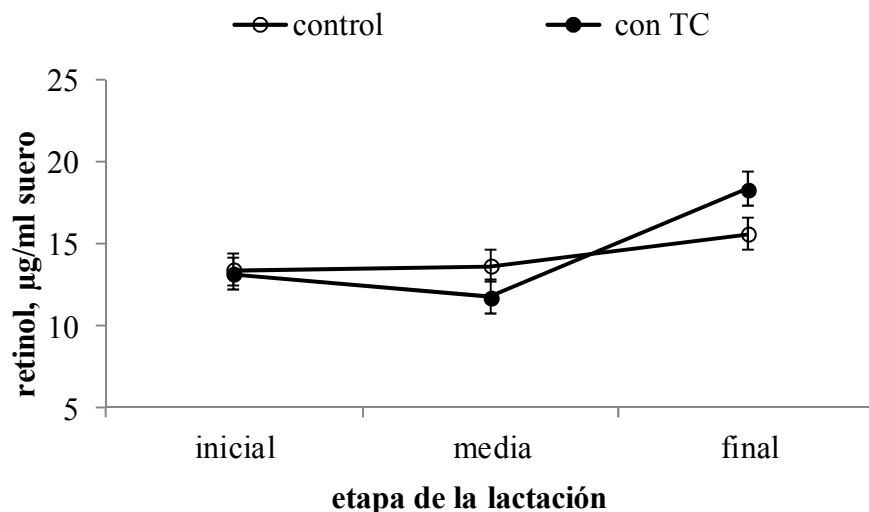


Figura 14. Concentración de retinol en el plasma de la oveja en las fases de la lactación según la inclusión de taninos condensados en el pienso.

Control: pienso control; con TC: pienso con 10% de quebracho (75% de TC)

El efecto de la inclusión de taninos de taninos condensados sobre la concentración de retinol en el plasma podría ser debida a la protección de los polifenoles frente a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad que transportan el retinol. Sin embargo, estudios en humana no han encontrado efecto de la ingestión de polifenoles del vino o del té en la oxidación de las lipoproteínas del plasma y por lo tanto sería esperable que tampoco lo tuvieran sobre la concentración del retinol que se transportan dichas lipoproteínas (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). En otro estudio en humana, la adición de catequina, (componente del quebracho), si que tuvo efecto sobre la concentración de β -caroteno y α -tocoferol en el plasma, pero no se estudio efecto sobre la concentración de retinol (Lotito y Fraga, 2000). En el presente estudio, la incorporación de quebracho a la dieta fue propablemente insuficiente como para ver los efectos en el plasma.

Con respecto al incremento de concentración de retinol en las ovejas de pastoreo se puede deber, tal y como se ha explicado anteriormente, a que en la fase inicial de la lactación, los rumiantes excretan retinol en la leche por lo que desciende con respecto a la fase final de la gestación el retinol en el plasma pero conforme avanza la lactación, las concentraciones de retinol se recuperan a las concentraciones previas al parto (Debier *et al.*, 2005)

Las concentración de α -tocoferol en el plasma de las ovejas tampoco se vio afectado por la inclusion de taninos en el pienso de la oveja ($P = 0,66$) pero si por la fase de la lactación ($P < 0,001$) (Figura 15).

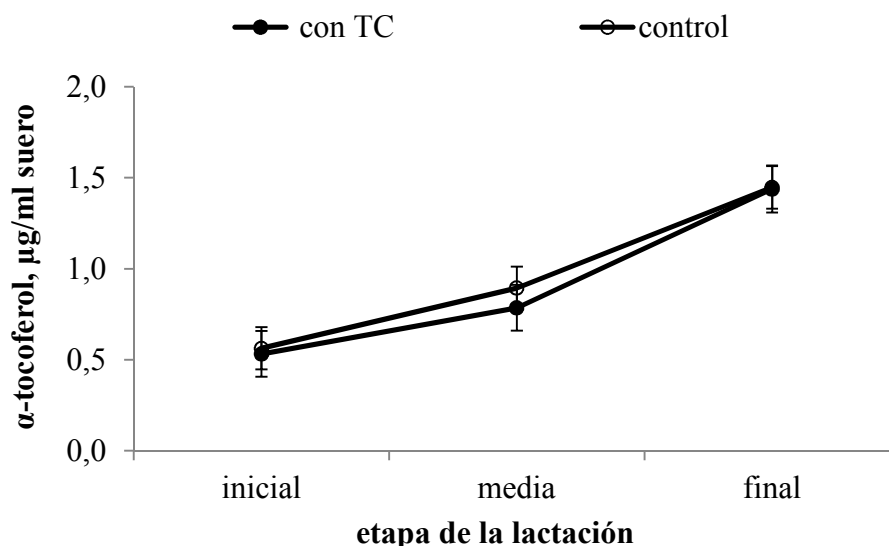


Figura 15. Concentración de α -tocoferol e el plasma de la oveja según la inclusión de taninos condensados en el pienso durante la lactación

Control: pienso control; con TC: pienso con 10% de quebracho (75% de TC).

Al igual que el retinol, el α -tocoferol se transporta en el plasma ligado a las lipoproteínas de baja densidad, y la ingestión de polifenoles no parece afectar a las dichas lipoproteínas en el plasma (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). En un estudio en humanos se ha comprobado que los taninos condensados y parte del α -tocoferol se transporta en las albuminas en el plasma (Li *et al.*, 2013), lo que por su efecto antioxidante los taninos protegerían el tocoferol circulante. En este sentido, en un estudio en humanos se observa que la adición de catequina, modificó la concentración de α -tocoferol en el plasma (Lotito y Fraga, 2000). El escaso efecto que tuvo la inclusion de quebracho en el pienso puede ser debido a la baja concentración de taninos condensados así como la escasa eficacia que presentan la adición de quebracho sobre la producción animal (Carreño *et al.*, 2015).

La concentración de α -tocoferol se incrementó un 35% la primera mitad ($P=0,01$) y un 42% en la segunda mitad de la lactación ($P = 0,001$). Tal y como se ha explicado con anterioridad, la concentración baja de α -tocoferol en el plasma de las ovejas en las primeras fases de la lactación se debe a la mayor acumulación de α -tocoferol en el calostro alrededor del parto (Debier *et al.*, 2005).

5.3.2. En la leche en la oveja

La concentración de retinol en la leche se vio afectada por la interacción entre la adición de taninos condensados en el pienso y la semana de lactación ($P < 0,01$) (Figura 16). La concentración de retinol en la leche de las ovejas que recibieron el pienso control se redujo paulatinamente desde la primera a la cuarta semana, no modificándose entre la cuarta y la quinta semana ($P = 0,19$). En cambio, en las ovejas que recibieron el pienso con el 10% de taninos condensados, el retinol de la leche se redujo rápidamente entre la primera y tercera semana ($P < 0,001$), permaneciendo estable hasta la quinta semana ($P = 0,57$).

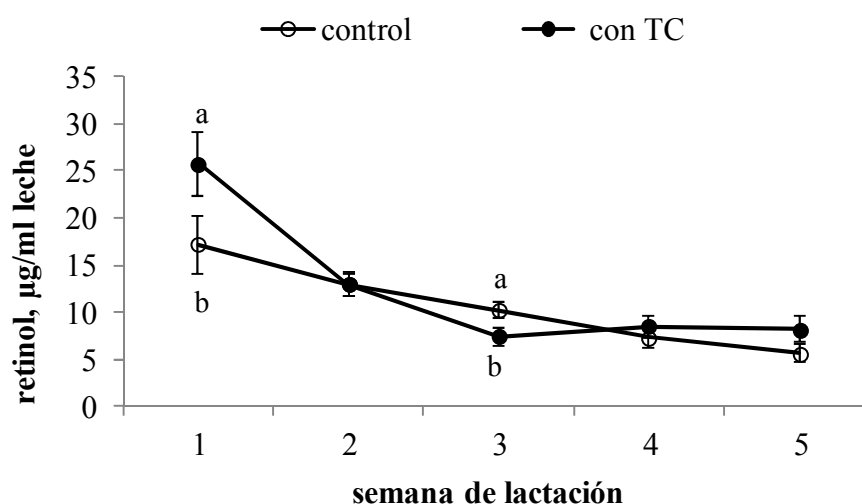


Figura 16. Concentración de retinol en la leche según la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja durante la lactación.

Control: pienso control; con TC: pienso con 10% de quebracho (75% de TC)

Las diferentes pautas supusieron que la inclusión de taninos condensados en la dieta incrementó la concentración de retinol en la leche comparada con el control en la primera semana (25,9 vs. 17,1 µg/ml para 10%TC y control respectivamente; $P = 0,04$) mientras que la redujo en la tercera semana (7,4 vs. 10,2 µg/ml para 10%TC y control respectivamente; $P = 0,05$).

No está claro el motivo del incremento del retinol en la primera semana de la lactación con la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja. Según Craig (1997), los flavonoides tienen un efecto sobre las vitaminas con poder antioxidante, potenciando su actividad. Los polifenoles son capaces de proteger las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). La protección de las catequinas frente a la oxidación del β -caroteno en el plasma podría pensarse que

también tiene lugar frente a la oxidación del retinol de la leche. Al tener mayor concentración de retinol en el calostro y en el inicio de la lactación podría ser que el efecto de la protección fuera más evidente, incrementándose por tanto la concentración de retinol en la leche de los animales que ingirieron pienso con taninos condensados comparados con los del pienso Control.

La concentración de α -tocoferol tendió a ser diferente según la inclusión de taninos condensados en el pienso según la semana de la lactación ($P = 0,08$) (Figura 17). En la primera semana de la lactación, la concentración de α -tocoferol en la leche fue superior en las ovejas del pienso con taninos condensados que en las del pienso control ($P = 0,03$), pero no aparecieron diferencias en el resto de semanas ($P > 0,05$). En promedio, la inclusión de taninos condensados en la dieta incrementó la concentración de α -tocoferol en la leche (0,66 vs. 0,48 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,02$).

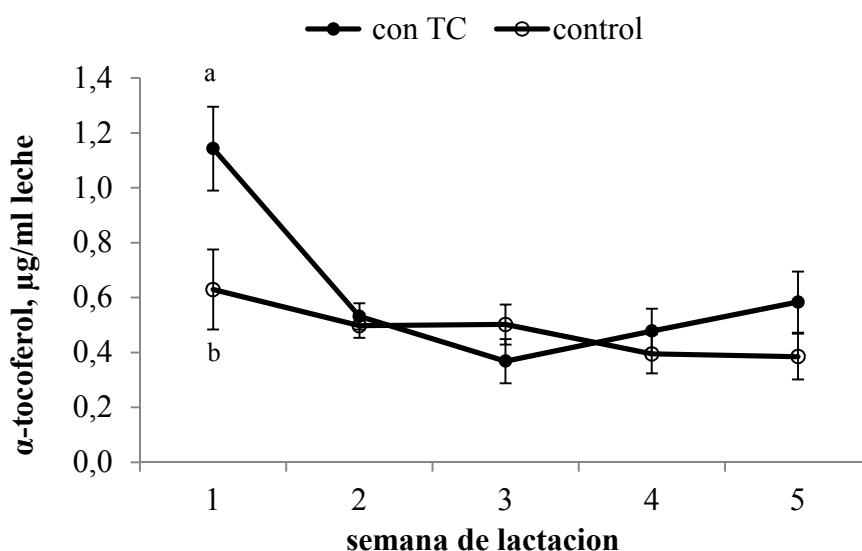


Figura 17. Concentración de α -tocoferol en la leche según la inclusión de taninos condensados en la dieta durante la lactación.

Al igual que en el retinol, no existen estudios que relacionen la incorporación de taninos condensados con la concentración de α -tocoferol en la leche. Podemos suponer que se los taninos condensados potencian el efecto del α -tocoferol al ser una vitamina antioxidante (Craig, 1997).

Se ha visto que cuando se añade catequina a la leche se reduce la degradación del retinol y α -tocoferol de la leche por parte de la luz (Jung, 2011). Podría ser que la catequina aportada por el quebracho ingerido por la oveja protegiera de la degradación al α -tocoferol de la leche y por eso la concentración en las ovejas que recibieron el pienso

con taninos condensados tuviera mayor concentración de éste. Según un estudio de Pazos *et al.* (2009), la reducción de los radicales de α -tocoferil en la presencia de proantocianidinas y otros compuestos fenólicos se atribuye a que los compuestos fenólicos donan electrones o átomos de hidrógeno al radical de α -tocoferil y por tanto recuperan la actividad antioxidante del α -tocoferol.

5.3.3. En el plasma del cordero

La inclusión de taninos en el pienso de la madre tampoco tuvo efecto sobre la concentración de retinol en el plasma de los corderos en ninguna de las fases de la lactación ($P = 0.50$) (Figura 18). La escasa cantidad de taninos condensados que ingirieron los corderos a través de la leche de su madre no fue suficiente para afectar a la concentración del retinol del plasma de los corderos.

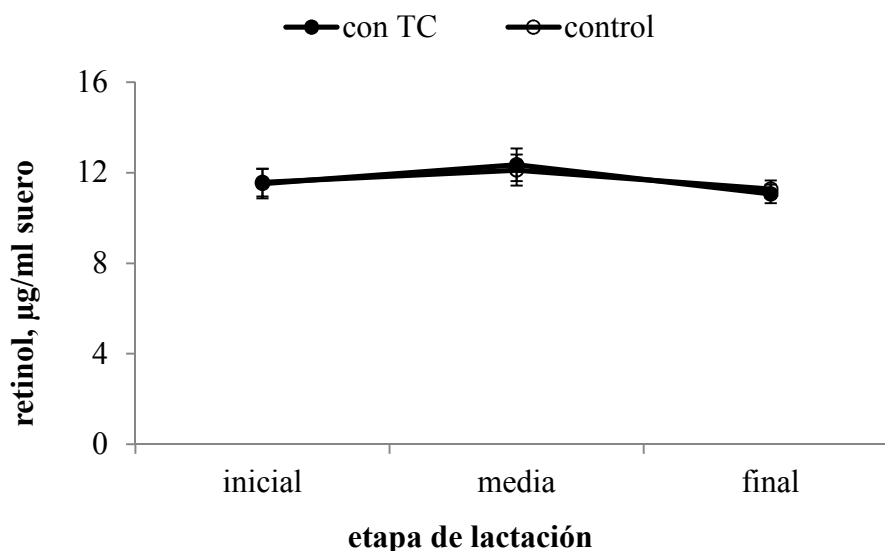


Figura 18. Concentración de retinol en el plasma de los corderos según la inclusión de taninos en el pienso de la madre.

La inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja afectó al contenido de α -tocoferol en el plasma de los corderos en la mitad de la lactación ($P = 0.03$) (Figura 19), presentando los corderos cuyas madres recibieron la suplementación de taninos condensados mayor concentración que aquellos cuyas madres recibieron el pienso control. En global, durante toda la lactación, los corderos del tratamiento Con Taninos Condensados presentaron una concentración ligeramente más elevada que los corderos del tratamiento Control (1,22 vs. 1,10 $\mu\text{g/ml}$; $P = 0.08$). Las pequeñas diferencias anteriormente anotadas sobre el contenido en α -tocoferol en la leche de la madre, son

responsables de una ligera mayor ingestión de α -tocoferol por parte de los corderos del tratamiento taninos condensados, lo que se ha reflejado en el plasma de los corderos.

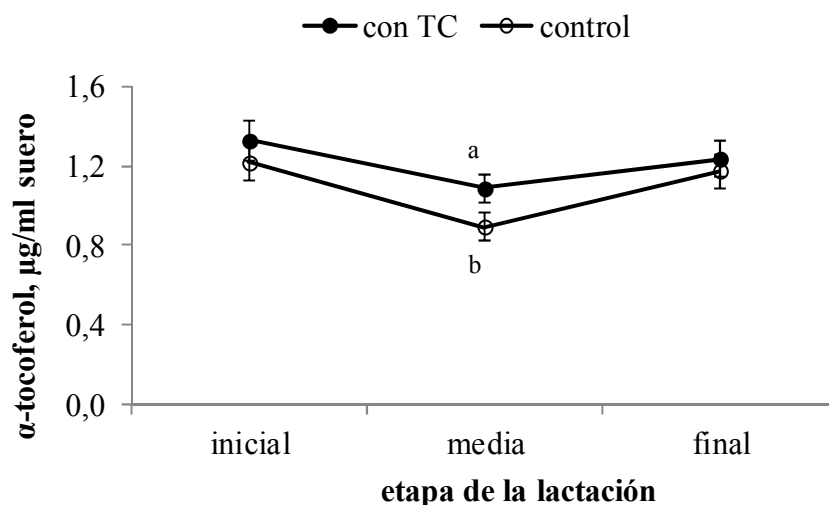


Figura 19. Concentración de α -tocoferol en el plasma de los corderos según la inclusión de taninos en el pienso de la madre.

5.3.4. En el músculo del cordero

La concentración de retinol en el músculo se vio afectada por el tipo de músculo ($P < 0,001$) pero no por la inclusión de taninos condensados en el pienso ($P = 0,85$). Dado que en el plasma de los corderos no se encontraron diferencias en la concentración de retinol debidas a la inclusión de taninos condensados en el pienso de las madres era esperable que tampoco las hubiera en el músculo. De media, la concentración de retinol fue superior en el músculo *Semitendinosus* que en el *Longissimus thoracis* (0,74 vs. 0,42 $\mu\text{g/kg}$ MF, respectivamente; $P < 0,001$). En corderos lechales, Osorio *et al.* (2008), encontraron más retinol en el músculo de la pierna que en músculo *Longissimus thoracis*, en vacuno Gobert *et al.* (2010) encontraron más retinol en el músculo *Longissimus thoracis* que en el músculo *Semitendinosus* a diferencia del porcino donde se ha visto más α -tocoferol en el músculo *Semitendinosus* que *Longissimus thoracis* (Realini *et al.*, 2013).

La concentración de α -tocoferol en el músculo se vio afectada por la inclusión de taninos condensados en el pienso de las ovejas de manera diferente en los dos músculos estudiados (Figura 20). La inclusión de taninos condensados en el pienso de las ovejas afectó a la concentración de α -tocoferol en el músculo *Longissimus thoracis* ($P = 0,04$)

pero no en el *Semitendinosus*. Además la concentración fue mayor en el músculo *Longissimus thoracis* que en el *Semitendinosus* (1,36 vs. 1,09 mg/kg MF; $P < 0,001$).

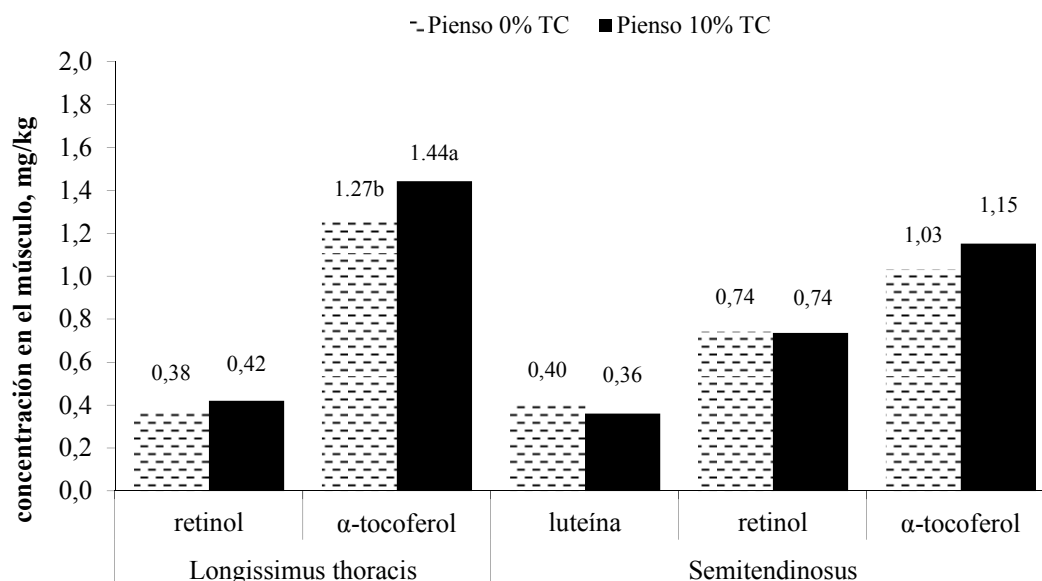


Figura 20. Contenido de luteína, retinol y α -tocoferol en el músculo *Longissimus thoracis* y *Semitendinosus* de los corderos según la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja.

Dentro de un parámetro y músculo, letras diferentes (a,b) indican diferencias al $P < 0,05$

La concentración de α -tocoferol se incrementó un 14% con la inclusión de taninos condensados en el pienso en el músculo *Longissimus thoracis* ($P = 0,04$) pero no se incrementó en el músculo *Semitendinosus* ($P = 0,16$) (Figura 20). Un posible efecto indirecto de los taninos como antioxidantes podría implicar la modificación de la absorción y deposición de la vitamina E en el músculo. Una dieta con extracto de uva, que contiene taninos condensados, no modificó la concentración de α -tocoferol en el músculo *Longissimus dorsi* de corderos comparado con la dieta control (Muíño *et al.*, 2014). Sin embargo, la dosis empleada en dicho estudio no modificó los polifenoles en el músculo ni la oxidación lipídica. Sin embargo, en otro estudio de corderos la inclusión de taninos del sorgo tuvo efecto antioxidante en la carne, aunque no evaluaron la concentración de α -tocoferol (Luciano *et al.*, 2011). En terneros, la inclusión de taninos condensados con el sorgo no modificó la cantidad de α -tocoferol el músculo *Longissimus lumborum* de terneros, pero redujo la concentración de γ -tocoferol (Larraín *et al.*, 2008).

Con respecto a la distinta deposición de α -tocoferol en los músculos estudiados, los resultados obtenidos muestran que el α -tocoferol se acumula menos en *Semitendinosus* que en *Longissimus thoracis* (1,09 vs. 1,35 mg/kg FM), al revés que el retinol. Osorio *et al.* (2008) encontraron también diferencias entre músculos en corderos lechales. Existe una interacción entre la deposición de carotenoides y tocoferoles en el músculo en vacuno (Yang *et al.*, 2002, Descalzo *et al.*, 2005) por lo que se podría suponer que también podría existir entre el retinol y α -tocoferol en corderos lechales. Según den Hertog-Meischke *et al.* (1997), las diferencias en α -tocoferol entre músculos se deben a diferencias en el número de mitocondrias entre músculos, que es donde se almacena el α -tocoferol.

5.4. Análisis discriminantes

Se ha realizado un análisis discriminante con las concentraciones de retinol y α -tocoferol para el plasma y leche de las ovejas, plasma y músculos de los corderos. En las siguientes figuras se presenta el porcentaje de animales clasificados correctamente según el forraje ingerido por la oveja y según la inclusión de los taninos condensados en el pienso de la oveja.

- Análisis discriminante del plasma de las ovejas.

El análisis discriminante utilizando el retinol y α -tocoferol determinado en el plasma en las tres fases de la lactación fue más preciso según el forraje ingerido por la oveja que según la inclusión de taninos condensados en el pienso de la oveja (Figura 21). Dicho análisis llega a clasificar correctamente más de 70 % de los animales alimentados con heno y más del 65% de los animales alimentados con pasto. La mayor precisión en el pastoreo se da en el último muestreo, momento en el cual presentaron la mayor concentración de dichas vitaminas. El análisis discriminante del plasma con respecto a la inclusión de taninos condensados en el pienso no dio buenos resultados. Podría ser que la menor variabilidad entre las ovejas que ingerían heno (tratamientos Estabulado) haga más fácil su clasificación.

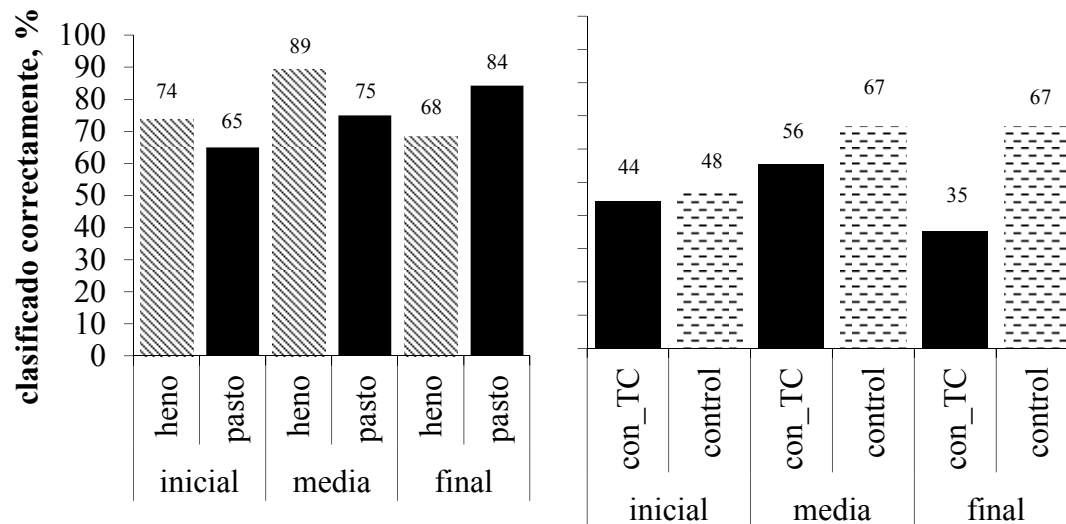


Figura 21. Porcentaje de ovejas clasificadas en su tratamiento según la concentración de retinol y α -tocoferol en el plasma en las tres fases de la lactación.

- *Análisis discriminante de la leche de las ovejas.*

Las ovejas del lote Estabulado se clasificaron correctamente por encima del 70% en todas las semanas de lactación, mientras que las del lote Pastoreo se clasificaron peor, especialmente en la última semana de la lactación, momento en el cual había únicamente 6 ovejas y 4 presentaron menor concentración de la esperable en condiciones de pastoreo.

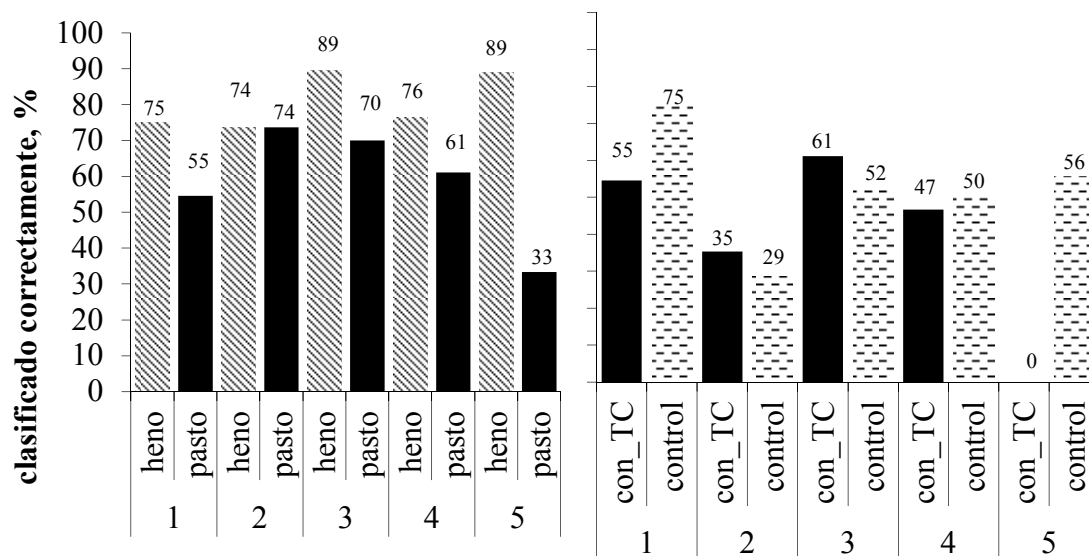


Figura 22. Porcentaje de ovejas clasificadas en su tratamiento según la concentración de retinol y α -tocoferol en la leche según la semana de la lactación.

Al igual que en el plasma de las ovejas, dado que sólo se vieron efectos puntuales de los taninos condensados en el pienso de las ovejas sobre la concentración de las vitaminas, tampoco el análisis discriminante fue capaz de diferenciar correctamente entre lotes.

- *Análisis discriminante del plasma de los corderos*

El análisis discriminante del plasma de los corderos clasificó correctamente más del 70% de los corderos del lote Estabulado mientras que la clasificación en los corderos del lote Pastoreo no fue buena en los primeros muestreos pero fue del 80% en el muestreo previo al sacrificio (Figura 23). El porcentaje de acierto es superior al encontrado por Álvarez *et al.* (2014) en corderos ligeros utilizando el retinol y α -tocoferol en el plasma de los corderos en el momento del sacrificio. La clasificación según la inclusión de taninos condensados en el pienso no fue buena.

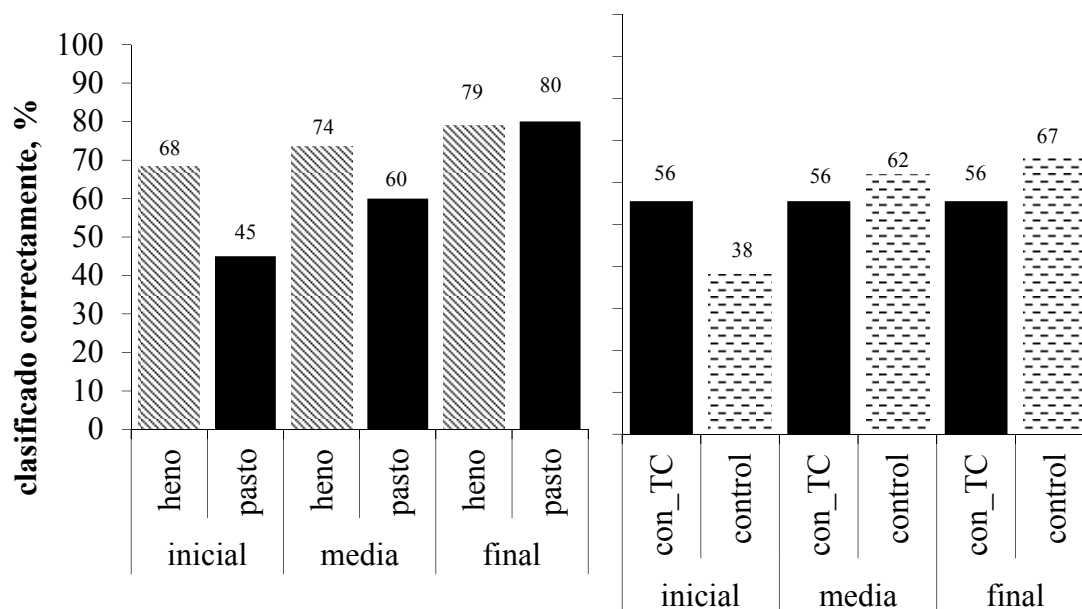


Figura 23. Porcentaje de corderos clasificados en su tratamiento según la concentración de retinol y α -tocoferol en el plasma según la fase de la lactación.

- *Análisis discriminante de los músculos de los corderos*

La clasificación de los corderos según la concentración de retinol, tocoferol en el *Longissimus thoracis* y el *Semitendinosus* en los corderos del lote Estabulado fue correcta en más del 87% de los corderos y en los del lote Pastoreo del 75% (Figura 24). No se consigue una buena clasificación de los corderos según la inclusión de taninos condensados en el pienso de las ovejas.

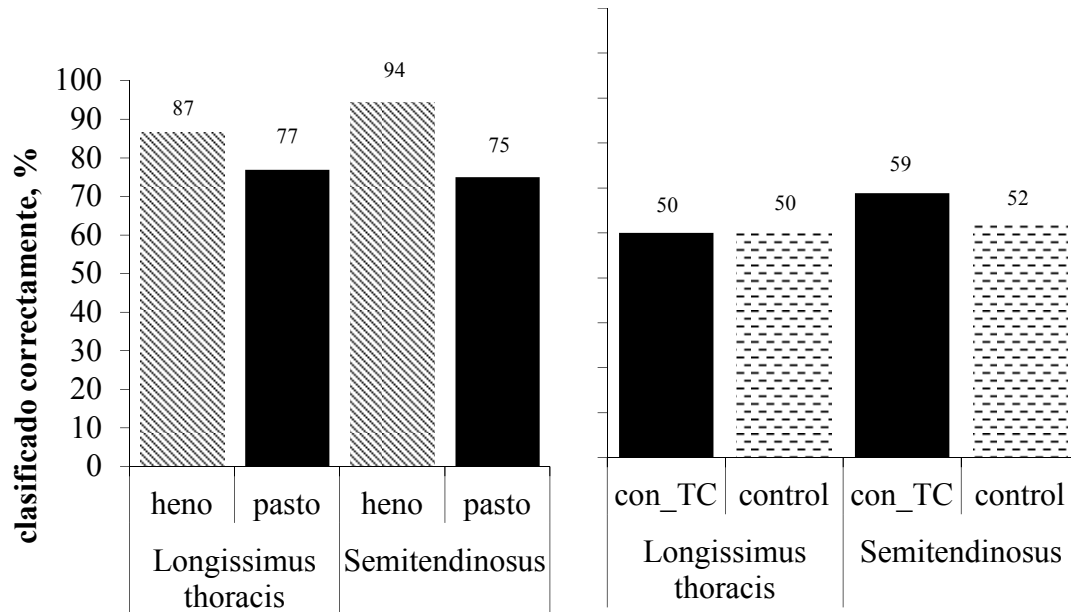


Figura 24. Porcentaje de corderos clasificados en su tratamiento según la concentración de retinol y α -tocoferol en el músculo.

En resumen, se puede observar que la utilización del retinol y α -tocoferol en los distintos productos animales utilizados no clasifica al 100% a los animales según el forraje ingerido por lo que se debería complementar con otros biomarcadores, como podrían ser los ácidos grasos de cadena larga o los ácidos grasos omega 3.

6. CONCLUSIONES

Como conclusiones generales del presente trabajo se puede decir:

1. La pradera presentó mayor concentración en carotenoides y tocoferoles que el heno de pradera y el pienso.
2. La concentración de retinol y de α -tocoferol en el plasma de la oveja se ha visto afectada por la interacción entre el forraje recibido y la fase de la lactación. Las ovejas del tratamiento Estabulado presentaron menores concentraciones de retinol y α -tocoferol que las de Pastoreo. En el grupo Pastoreo dichas concentraciones incrementaron a medida que avanzaba la lactación. La inclusión de taninos condensados no tuvo efecto.
3. La concentración de retinol y de α -tocoferol en la leche dependieron tanto del forraje recibido como de la semana de la lactación (la primera semana presentó mayor concentración de retinol y α -tocoferol que las otras semanas). La inclusión de taninos condensados tuvo efecto en la primera sobre la concentración del retinol y de α -tocoferol. En promedio, la inclusión de taninos condensados incrementó la concentración de α -tocoferol de la leche.
4. Los corderos lactantes en pastoreo cuyas madres fueron alimentadas con hierba fresca presentaron mayor concentración de retinol y de α -tocoferol en el plasma que los corderos estabulados cuyas madres fueron alimentadas con heno.
5. Los corderos del tratamiento Pastoreo presentaron mayor concentración de α -tocoferol en el músculo *Longissimus thoracis* y *Semitendinosus* que los corderos estabulados y mayor concentración de retinol en el *Semitendinosus*. La luteína sólo se acumuló en el músculo *Semitendinosus*, siendo mayor en los corderos del tratamiento Pastoreo que en los del Estabulado. La inclusión de taninos condensados incrementó el contenido de α -tocoferol en el músculo *Longissimus thoracis*.
6. Finalmente, la fiabilidad de la discriminación de los corderos debe mejorarse con la ayuda de otros biomarcadores. De acuerdo con su sistema de alimentación (pastoreo vs. estabulado), el porcentaje de clasificación correcta de la carne de cordero fue superior al 75%, estando mejor clasificados los corderos que procedían del tratamiento Estabulado. La clasificación según la inclusión o no de taninos fue imprecisa, por lo que se debe seguir estudiando.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acamovic T y Brooker JD 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 64, 403-412.
- Addis M, Cabiddu A, Pinna G, Decandia M, Piredda G, Pirisi A y Molle G 2005. Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid cis-9, trans-11. *Journal of Dairy Science* 88, 3443-3454.
- AlSenaidy AM 1996. Distribution of alpha- and gamma-tocopherols within blood fractions of ruminants. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 115, 223-227.
- Álvarez-Rodríguez J 2005. Extensificación ovina en zona de montaña: estrategias de manejo durante la lactación de ovejas Churra tensina con parto en primavera. Proyecto fin de carrera. Universidad de Lleida.
- Álvarez-Rodríguez J, Sanz A, Delfa R, Revilla R y Joy M 2007. Performance and grazing behaviour of Churra Tensina sheep stocked under different management systems during lactation on Spanish mountain pastures. *Livestock Science* 107, 152-161.
- Álvarez R, Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM y Alcalde MJ 2014. Effect of pasture and concentrate diets on concentrations of carotenoids, vitamin A and vitamin E in plasma and adipose tissue of lambs. *Journal of Food Composition and Analysis* 36, 59-65.
- Álvarez R, Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM y Alcalde MJ 2015. Carotenoid and vitamin A content in biological fluids and tissues of animals as an effect of the diet. A review. *Food Reviews International*, null-null.
- Arnett AM, Dikeman ME, Spaeth CW, Johnson BJ y Hildabrand B 2007. Effects of vitamin A supplementation in young lambs on performance, serum lipid, and longissimus muscle lipid composition. *Journal of Animal Science* 85, 3062-3071.
- Asadian A, Mézes M y Mirhadi SA 1996. Effect of vitamins A and E on blood plasma vitamin status and daily body mass gain of different fat-tailed sheep breeds. *Acta Veterinaria Hungarica* 44, 99-109.
- Ballet N, Robert JC y Williams PEV 2001. Vitamins in Forages In *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition* (Ed. EO D I Givens, R F E Axford, M H Omed), pp. 762-763. *British Journal of Nutrition*.

- Barron M, Gonzalez A, Gonzalez L, Ruiz-Lopez F, Shimada A y Mora O 2012. Studies on the carotenoid content in forage species and tropical beef cattle in Mexico. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 55, 21-29.
- Bates CJ 1983. Vitamin A in pregnancy and lactation. *Proceedings of the Nutrition Society* 42, 65-79.
- Batra TR y Hidirolou M 1995. Vitamin A in milk of ewes. *Canadian Journal of Animal Science* 75, 263-265.
- Bjørneboe A, Bjørneboe G-EA y Drevon CA 1990. Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E. *The Journal of Nutrition* 120, 233-242.
- Blaner WS 1994. Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 16559-16565.
- Blomhoff R y Kiil BH 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology* 66, 606-630.
- Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T y Norum KR 1991. Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiological Reviews* 71, 951-990.
- Blum JW, Hadorn U, Sallmann H-P y Schuep W 1997. Delaying Colostrum Intake by One Day Impairs Plasma Lipid, Essential Fatty Acid, Carotene, Retinol and α -Tocopherol Status in Neonatal Calves. *The Journal of Nutrition* 127, 2024-2029.
- Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA y Wagner KH 2000. Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 913-938.
- Brown F 1953. The tocopherol content of farm feeding-stuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 4, 161-165.
- Bruhn JC y Oliver JC 1978. Effect of Storage on Tocopherol and Carotene Concentrations in Alfalfa Hay. *Journal of Dairy Science* 61, 980-982.
- Butler G, Nielsen JH, Slots T, Seal C, Eyre MD, Sanderson R y Leifert C 2008. Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1431-1441.
- Buxadé Carbó C 2014. Situación actual y perspectivas de futuro del sector ovino de carne en España. In, Universidad Politécnica de Madrid (UPM).
- Cabiddu A, Molle G, Decandia M, Spada S, Fiori M, Piredda G y Addis M 2009. Responses to condensed tannins of flowering sulla (*Hedysarum coronarium* L.)

- grazed by dairy sheep Part 2: Effects on milk fatty acid profile. *Livestock Science* 123, 230-240.
- Calderón F, Chauveau-Duriot B, Martin B, Graulet B, Doreau M y Nozière P 2006. Variations in Carotenoids, Vitamins A and E, and Color in Cow's Plasma and Milk During Late Pregnancy and the First Three Months of Lactation. *Journal of Dairy Science* 90, 2335-2346.
- Calderón F, Chauveau-Duriot B, Pradel P, Martin B, Graulet B, Doreau M y Nozière P 2007. Variations in Carotenoids, Vitamins A and E, and Color in Cow's Plasma and Milk Following a Shift from Hay Diet to Diets Containing Increasing Levels of Carotenoids and Vitamin E. *Journal of Dairy Science* 90, 5651-5664.
- Capper JL, Wilkinson RG, Kasapidou E, Pattinson SE, Mackenzie AM y Sinclair LA 2005. The effect of dietary vitamin E and fatty acid supplementation of pregnant and lactating ewes on placental and mammary transfer of vitamin E to the lamb. *British Journal of Nutrition* 93, 549-557.
- Carreño D, Hervas G, Toral PG, Belenguer A y Frutos P 2015. Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate in vitro ruminal biohydrogenation in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 202, 42-51.
- Casasús I 1998. Contribución al estudio de los sistemas de producción de ganado vacuno en zonas de montaña: efecto de la raza y de la época de pasto sobre la ingestión voluntaria de forrajes y los rendimientos en pastoreo.
- Casasús I, Bergua A, Revilla R, San Juan L y Olleta JL 1994. La oveja Churra Tensina: caracterización productiva y reproductiva. In (Ed. AdlXRcdl S.E.O.C.), pp. 401-408. Burgos.
- Casasús I, Choquecallata J, Bergua A, Sanz A y Revilla R 1996. Extensificación de la producción ovina; un ejemplo de explotaciones en zona de montaña In (Ed. AdlXRCdl S.E.E.P.), pp. 313-317. Logroño.
- Casasús I, Bernués A, Sanz A, Villalba D, Riedel JL y Revilla R 2007. Vegetation dynamics in Mediterranean forest pastures as affected by beef cattle grazing. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121, 365-370.
- Craig WJ 1997. Phytochemicals: Guardians of our Health. *Journal of the American Dietetic Association* 97, S199-S204.
- Creus Novau J 1983. El clima del Alto Aragón occidental. CSIC - Instituto de Estudios Pirenaicos.

- Charlier C 2003. La traçabilité comme un standard de production. *Économie rurale*, 5-18.
- Chawla R y Kaur H 2004. Plasma antioxidant vitamin status of periparturient cows supplemented with α -tocopherol and β -carotene. *Animal Feed Science and Technology* 114, 279-285.
- Choquecallata J 2000. Interrelaciones entre el gradiente de intensificación reproductiva, las estrategias alimentarias y la economía de la explotación. Tesis Doctoral. Pamplona.
- D'Alessandro AG, Maiorano G, Kowalishyn B, Loiudice P y Martemucci G 2012. How the nutritional value and consumer acceptability of suckling lambs meat is affected by the maternal feeding system. *Small Ruminant Research* 106, 83-91.
- Debier C y Larondelle Y 2005. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition* 93, 153-174.
- Debier C, Pottier J, Goffe C y Larondelle Y 2005. Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk. *Livestock Production Science* 98, 135-147.
- Delgado-Pertíñez M, Gutiérrez-Peña R, Mena Y, Fernández-Cabanás VM y Laberye D 2013. Milk production, fatty acid composition and vitamin E content of Payoya goats according to grazing level in summer on Mediterranean shrublands. *Small Ruminant Research* 114, 167-175.
- den Hertog-Meischke MJA, Smulders FJM, Houben JH y Eikelenboom G 1997. The effect of dietary vitamin E supplementation on drip loss of bovine Longissimus lumborum, psoas major and Semitendinosus muscles. *Meat Science* 45, 153-160.
- Descalzo AM, Insani EM, Biolatto A, Sancho AM, García PT, Pensel NA y Josifovich JA 2005. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science* 70, 35-44.
- Dian PHM, Chauveau-Duriot B, Prado IN y Prache S 2007. A dose-response study relating the concentration of carotenoid pigments in blood and reflectance spectrum characteristics of fat to carotenoid intake level in sheep. *Journal of Animal Science* 85, 3054-3061.
- Doney JM, Peart JN, Smith WF y Louda F 1979. A consideration of the techniques for estimation of milk yield by suckled sheep and a comparison of estimates obtained by two methods in relation to the effect of breed, level of production and stage of lactation. *The Journal of Agricultural Science* 92, 123-132.

- Donoghue S, Richardson DW, Kronfeld DS y Sklan D 1984. Placental transport of retinol in ewes fed excessive intakes of vitamin A. *Canadian Journal of Animal Science* 64, 255-256.
- Drevon CA 1991. Absorption, Transport and Metabolism of Vitamin E. *Free Radical Research* 14, 229-246.
- Falk J y Munné-Bosch S 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 61, 1549-1566.
- Frutos P, Hervás G, Giráldez FJ y Mantecón AR 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. 2004 2.
- Gentili A, Caretti F, Bellante S, Ventura S, Canepari S y Curini R 2012. Comprehensive Profiling of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Milk from Different Animal Species by LC-DAD-MS/MS Hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 1628-1639.
- Gobert M, Gruffat D, Habeanu M, Parafita E, Bauchart D y Durand D 2010. Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation. *Meat Science* 85, 676-683.
- Goff JP y Stabel JR 1990. Decreased Plasma Retinol, α -Tocopherol, and Zinc Concentration During the Periparturient Period: Effect of Milk Fever. *Journal of Dairy Science* 73, 3195-3199.
- Gonzalez-Calvo L, Ripoll G, Molino F, Hugo Calvo J y Joy M 2015. The relationship between muscle alpha-tocopherol concentration and meat oxidation in light lambs fed vitamin E supplements prior to slaughter. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 103-110.
- González-Calvo L, Blanco M, Ripoll G, Molino F, Calvo JH y Joy M 2014. Influence of grazing on meat oxidation in light lamb. *Options Méditerranéennes* 109.
- Guidera J, Kerry JP, Buckley DJ, Lynch PB y Morrissey PA 1997. The effect of dietary vitamin E supplementation on the quality of fresh and frozen lamb meat. *Meat Science* 45, 33-43.
- Halliwell B 1996. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition* 16, 33-50.
- Hathcock JN, Hattan DG, Jenkins MY, McDonald JT, Sundaresan PR y Wilkening VL 1990. Evaluation of vitamin A toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 52, 183-202.

- Joy M, Alvarez-Rodriguez J, Revilla R, Delfa R y Ripoll G 2008. Ewe metabolic performance and lamb carcass traits in pasture and concentrate-based production systems in Churra Tensina breed. *Small Ruminant Research* 75, 24-35.
- Jung M 2011. Effects of green tea catechin on the lipid oxidation, volatile compound formation, and losses of retinol and α -tocopherol in whole milk during light illumination as compared with ascorbic acid. *Food Science and Biotechnology* 20, 1425-1434.
- Kalač P 1983. Losses of beta-carotene in unwilted forage crops during silage-making and feeding. *Animal Feed Science and Technology* 9, 63-69.
- Kalač P y McDonald P 1981. A review of the changes in carotenes during ensiling of forages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32, 767-772.
- Kasapidou E, Enser M, Wood J, Richardson R, Wilkinson R y Sinclair L 2009. Influence of vitamin E supplementation and basal diet on the vitamin E status performance and tissue fatty acid concentration in lambs. *Animal* 3, 516 - 526.
- Koutsoumpas AT, Giadinis ND, Lafi SQ, Petridou EJ, Karatzia MA y Karatzias H 2013. Serum vitamin A and vitamin E concentrations after parenteral vitamin A administration in sheep. *Small Ruminant Research* 109, 28-30.
- Kumagai HW, CL. 1995. The effect of supplementary minerals, retinol and α -tocopherol on the vitamin status and productivity of pregnant Merino ewes. *Australian Journal of Agricultural Research* 46, 1159-1174.
- Kurilich AC y Juvik JA 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in Zea mays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1948-1955.
- Larraín RE, Schaefer DM, Richards MP y Reed JD 2008. Finishing steers with diets based on corn, high-tannin sorghum or a mix of both: Color and lipid oxidation in beef. *Meat Science* 79, 656-665.
- Launchbaugh K, Idaho Forest W y Station RE 2001. Anti-quality Factors in Rangeland and Pastureland Forages. University of Idaho.
- Lauzurica S, de la Fuente J, Díaz MT, Álvarez I, Pérez C y Cañeque V 2005. Effect of dietary supplementation of vitamin E on characteristics of lamb meat packed under modified atmosphere. *Meat Science* 70, 639-646.
- LeBlanc SJ, Herdt TH, Seymour WM, Duffield TF y Leslie KE 2004. Peripartum Serum Vitamin E, Retinol, and Beta-Carotene in Dairy Cattle and Their Associations with Disease. *Journal of Dairy Science* 87, 609-619.

- Lee JH, Waller JC y Melton SL 2005. Enhancing alpha-tocopherol and linoleic acid in ewe's milk by feeding emulsified sunflower oil and DL-alpha-tocopheryl acetate in a chemically treated protein matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6463-6468.
- Lee JH, Waller JC, Yilmaz Y y Melton SL 2007. Effect of feeding rumen-protected dietary protein–oil supplements on fatty acid composition and α -tocopherol content of blood serum and muscle lipids of lambs. *Small Ruminant Research* 72, 101-110.
- Li X, Chen D, Wang G y Lu Y 2013. Study of interaction between human serum albumin and three antioxidants: Ascorbic acid, α -tocopherol, and proanthocyanidins. *European Journal of Medicinal Chemistry* 70, 22-36.
- Lindqvist H, Nadeau E y Jensen SK 2012. Alpha-tocopherol and β -carotene in legume–grass mixtures as influenced by wilting, ensiling and type of silage additive. *Grass and Forage Science* 67, 119-128.
- Livingston AL, Knowles RE, Nelson JW y Kohler GO 1968a. Xanthophyll and carotene loss during pilot and industrial scale alfalfa processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16, 84-87.
- Livingston AL, Smith D, Carnahan HL, Knowles RE, Nelson JW y Kohler GO 1968b. Variation in the xanthophyll and carotene content of lucerne, clovers and grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 19, 632-636.
- Lopez-Bote C, Daza A, Soares M y Berges E 2001. Dose-response effect of dietary vitamin E concentration on meat quality characteristics in light-weight lambs. *Animal Science* 73, 451 - 457.
- Lotito SB y Fraga CG 2000. Catechins Delay Lipid Oxidation and α -Tocopherol and β -Carotene Depletion Following Ascorbate Depletion in Human Plasma. *Experimental Biology and Medicine* 225, 32-38.
- Loudenslager MJ, Ku PK, Whetter PA, Ullrey DE, Whitehair CK, Stowe HD y Miller ER 1986. Importance of Diet of Dam and Colostrum to the Biological Antioxidant Status and Parenteral Iron Tolerance of the Pig1. *Journal of Animal Science* 63, 1905-1914.
- Luciano G, Monahan FJ, Vasta V, Biondi L, Lanza M y Priolo A 2009. Dietary tannins improve lamb meat colour stability. *Meat Science* 81, 120-125.
- Luciano G, Vasta V, Monahan FJ, López-Andrés P, Biondi L, Lanza M y Priolo A 2011. Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of

- longissimus dorsi muscle from lambs fed a tannin-containing diet. Food Chemistry 124, 1036-1042.
- Lyan B, Azaïs-Braesco V, Cardinault N, Tyssandier V, Borel P, Alexandre-Gouabau M-C y Grolier P 2001. Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 751, 297-303.
- MAGRAMA 2008. Encuesta ganadera. Memoria. In (Ed. Ganadería), pp. 34-43. Subdirección General de Estadística
- MAGRAMA 2009. Razas de ganado. Catálogo oficial de España. In.
- MAGRAMA 2013. Informe ovino-caprino In (Ed. ganadería), p. 9. Subdirección General de Estadística.
- Martin B, Fedele V, Ferlay AG, P., Rock EG, D. y Chilliard Y 2004. Effects of grass-based diets on the content of micronutrients and fatty acids in bovine and caprine dairy products. In Land use systems in grassland dominated regions. Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federations, pp. 876-886. Grassland Science in Europe, Zürich, Switzerland.
- McDowell LR 2000. Vitamins in animal and human nutrition In, pp. 15-90. Iowa State University Press.
- McDowell LR, Williams SN, Hidirolou N, Njeru CA, Hill GM, Ochoa L y Wilkinson NS 1996. Vitamin E supplementation for the ruminant. Animal Feed Science and Technology 60, 273-296.
- Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM y Heredia FJ 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 54, 209-215.
- Meneses A, Batra TR y Hidirolou M 1994. Vitamin E and selenium in milk of ewes. Canadian Journal of Animal Science 74, 567-569.
- Molino F, Blanco M, Gonzalez-Calvo L, Ripoll G, Calvo JH y Joy M 2014. Effect of grazing alfalfa on a-tocopherol content and FA composition in Longissimus and Semitendinosus muscles of light lambs. Options Méditerranéennes A, 109.
- Muño I, Apeleo E, de la Fuente J, Pérez-Santaescolástica C, Rivas-Cañedo A, Pérez C, Díaz MT, Cañequ V y Lauzurica S 2014. Effect of dietary supplementation with red wine extract or vitamin E, in combination with linseed and fish oil, on lamb meat quality. Meat Science 98, 116-123.

- Njeru CA, McDowell LR, Wilkinson NS, Linda SB y Williams SN 1994. Pre- and postpartum supplemental DL-alpha-tocopheryl acetate effects on placental and mammary vitamin E transfer in sheep. *Journal of Animal Science* 72, 1636-1640.
- Nozière P, Graulet B, Lucas A, Martin B, Grolier P y Doreau M 2006a. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* 131, 418-450.
- Nozière P, Grolier P, Durand D, Ferlay A, Pradel P y Martin B 2006b. Variations in Carotenoids, Fat-Soluble Micronutrients, and Color in Cows' Plasma and Milk Following Changes in Forage and Feeding Level. *Journal of Dairy Science* 89, 2634-2648.
- Olson JA 1989. Provitamin A Function of Carotenoids: The Conversion of β -Carotene into Vitamin A. *The Journal of Nutrition* 119, 105-108.
- Osorio MT, Zumalacárregui JM, Cabeza EA, Figueira A y Mateo J 2008. Effect of rearing system on some meat quality traits and volatile compounds of suckling lamb meat. *Small Ruminant Research* 78, 1-12.
- Packer L 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *The American Journal of Clinical Nutrition* 53, 1050S-1055S.
- Palace VP, Khaper N, Qin Q y Singal PK 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 746-761.
- Park YW, Anderson MJ, Walters JL y Mahoney AW 1983. Effects of Processing Methods and Agronomic Variables on Carotene Contents in Forages and Predicting Carotene in Alfalfa Hay with Near-Infrared-Reflectance Spectroscopy^{1,2}. *Journal of Dairy Science* 66, 235-245.
- Pavel K 2013. Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review. *Journal of Agrobiology* 29 (1), 1-46.
- Pazos M, Lluís Torres J, Andersen ML, Skibsted LH y Medina I 2009. Galloylated Polyphenols Efficiently Reduce alpha-Tocopherol Radicals in a Phospholipid Model System Composed of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5042-5048.
- Peirce AW 1945. The effect of intake of carotene on the general health and on the concentration of carotene and of vitamin A in the blood and liver of sheep. *Aust J Exp Biol Med* 23, 295-303.

- Prache S, Priolo A y Grolier P 2003. Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: Its significance for the traceability of grass-feeding¹. *Journal of Animal Science* 81, 360-367.
- Prache S, Cornu A, Berdagué JL y Priolo A 2005. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research* 59, 157-168.
- Prache S, Kondjoyan N, Delfosse O, Chauveau-Duriot B, Andueza D y Cornu A 2009. Discrimination of pasture-fed lambs from lambs fed dehydrated alfalfa indoors using different compounds measured in the fat, meat and plasma. *Animal* 3, 598-605.
- Priolo A, Bella M, Lanza A, Galofaro V, Biondi L, Barbagallo D, Ben Salem H y Pennisi P 2005. Carcass and meat quality of lambs fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium* L.) with or without polyethylene glycol or concentrate. *Small Ruminant Research* 59, 281-288.
- Quaresma MAG, Trigo-Rodrigues I, Lemos J y Bessa RJB 2012. Effect of the finishing feeding system on total cholesterol, vitamin E and β -carotene contents in Alentejana purebred bullocks. In CIISA, *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinárias*.
- Rani A, Kumar V, Verma S, Shakya A y Chauhan GS 2007. Tocopherol Content and Profile of Soybean: Genotypic Variability and Correlation Studies. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84, 377-383.
- Realini CE, Pérez-Juan M, Gou P, Díaz I, Sárraga C, Gatellier P y García-Regueiro JA 2013. Characterization of Longissimus thoracis, Semitendinosus and Masseter muscles and relationships with technological quality in pigs. 2. Composition of muscles. *Meat Science* 94, 417-423.
- Renou J-P, Bielicki G, Deponge C, Gachon P, Micol D y Ritz P 2004a. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II: Beef meat. *Food Chemistry* 86, 251-256.
- Renou J-P, Deponge C, Gachon P, Bonnefoy J-C, Coulon J-B, Garel J-P, Vérité R y Ritz P 2004b. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. *Food Chemistry* 85, 63-66.
- Ripoll G, Joy M y Muñoz F 2007. Influencia de la vitamina E y del Selenio sobre la calidad de la carne de cordero. SESOC XXXII.

- Ripoll G, González-Calvo L, Molino F, Calvo JH y Joy M 2013. Effects of finishing period length with vitamin E supplementation and alfalfa grazing on carcass color and the evolution of meat color and the lipid oxidation of light lambs. *Meat Science* 93, 906-913.
- Santé-Lhoutellier V, Engel E y Gatellier P 2008. Assessment of the influence of diet on lamb meat oxidation. *Food Chemistry* 109, 573-579.
- Santos-Buelga C y Scalbert A 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1094-1117.
- Sanz A, Álvarez-Rodríguez J, Cascarosa I, Ripoll G, Carrasco S, Revilla R y Joy M 2008. Características de la canal de los tipos comerciales de cordero lechal, ternasco y pastenco en la raza Churra Tensina. *Información Técnica Económica Agraria* 104 (1), 42-57.
- Sayago A, Marin MI, Aparicio R y Morales MT 2007. Vitamin E and vegetable oils. *Grasas Y Aceites* 58, 74-86.
- Sies H 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* 25, 1058-1071.
- Slover H 1971. Tocopherols in foods and fats. *Lipids* 6, 291-296.
- Stahl W y Sies H 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1740, 101-107.
- Stahl W, Sundquist AR y Sies H 1994. Role of carotenoids in antioxidant defense. In (Ed. R Blomhoff), p. 704. *Vitamin A in Health and Disease*.
- Stahl W, Schwarz W, von Laar J y Sies H 1995. All-trans β -Carotene Preferentially Accumulates in Human Chylomicrons and Very Low Density Lipoproteins Compared with the 9-cis Geometrical Isomer. *The Journal of Nutrition* 125, 2128-2133.
- Thafvelin B y Oksanen HE 1966. Vitamin E and Linolenic Acid Content of Hay as Related to Different Drying Conditions¹. *Journal of Dairy Science* 49, 282-286.
- Toral PG, Hervás G, Bichi E, Belenguer Á y Frutos P 2011. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: Effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology* 164, 199-206.

- Toral PG, Hervás G, Belenguer A, Bichi E y Frutos P 2013. Effect of the inclusion of quebracho tannins in a diet rich in linoleic acid on milk fatty acid composition in dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 96, 431-439.
- Traber MG y Arai H 1999. Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annual Review of Nutrition* 19, 343-355.
- Traber MGS, Helmut 1996. Vitamin E in Humans: Demand and Delivery. *Annual Review of Nutrition* 16, 321-347.
- Turner KE, McClure KE, Weiss WP, Borton RJ y Foster JG 2002. Alpha-tocopherol concentrations and case life of lamb muscle as influenced by concentrate or pasture finishing. *Journal of Animal Science* 80, 2513-2521.
- Val J, Monge E y Baker NR 1994. An Improved HPLC Method for Rapid Analysis of the Xanthophyll Cycle Pigments. *Journal of Chromatographic Science* 32, 286-289.
- Vasta V, Pennisi P, Lanza M, Barbagallo D, Bella M y Priolo A 2007. Intramuscular fatty acid composition of lambs given a tanniniferous diet with or without polyethylene glycol supplementation. *Meat Science* 76, 739-745.
- Weir WC, Pope AL, Phillips PH y Bohstedt G 1949. The effect of a low carotene winter ration on the blood, milk, and liver. Concentration of vitamin A and vitamin C of ewes and their lambs. *Journal of Animal Science* 8, 381-391.
- Yang A, Larsen T y Tume R 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 43, 1809-1817.
- Yang A, Brewster M, Lanari M y Tume R 2002. Effect of vitamin E supplementation on alpha-tocopherol and beta-carotene concentrations in tissues from pasture and grain-fed cattle. *Meat Science* 60, 35 - 40.
- Zingg JM 2007. Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine* 28, 400-422.